

Този текст служи само за информационни цели и няма правно действие. Институциите на Съюза не носят отговорност за неговото съдържание. Автентичните версии на съответните актове, включително техните преамбюли, са версиите, публикувани в Официален вестник на Европейския съюз и налични в EUR-Lex. Тези официални текстове са пряко достъпни чрез връзките, публикувани в настоящия документ

► **V****РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 440/2008 НА КОМИСИЯТА**

от 30 май 2008 година

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)

(ОВ L 142, 31.5.2008 г., стр. 1)

Изменен със:

		Официален вестник		
		№	страница	дата
► <u>M1</u>	Регламент (ЕО) № 761/2009 на Комисията от 23 юли 2009 година	L 220	1	24.8.2009 г.
► <u>M2</u>	Регламент (ЕС) № 1152/2010 на Комисията от 8 декември 2010 година	L 324	13	9.12.2010 г.
► <u>M3</u>	Регламент (ЕС) № 640/2012 на Комисията от 6 юли 2012 година	L 193	1	20.7.2012 г.
► <u>M4</u>	Регламент (ЕС) № 260/2014 на Комисията от 24 януари 2014 година	L 81	1	19.3.2014 г.
► <u>M5</u>	Регламент (ЕС) № 900/2014 на Комисията от 15 юли 2014 година	L 247	1	21.8.2014 г.
► <u>M6</u>	Регламент (ЕС) 2016/266 на Комисията от 7 декември 2015 година	L 54	1	1.3.2016 г.
► <u>M7</u>	Регламент (ЕС) 2017/735 на Комисията от 14 февруари 2017 година	L 112	1	28.4.2017 г.



РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 440/2008 НА КОМИСИЯТА

от 30 май 2008 година

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)

Член 1

Методите на изпитване, които следва да се прилагат за целите на Регламент (ЕО) № 1907/2006, са посочени в приложението към настоящия регламент.

Член 2

Когато е целесъобразно, Комисията ще преразгледа методите на изпитване, съдържащи се в настоящия регламент, с цел заместване, намаляване или усъвършенстване на изпитванията върху гръбначни животни.

Член 3

Всички позовавания на приложение V към Директива 67/548/ЕИО се тълкуват като позовавания на настоящия регламент.

Член 4

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

Той се прилага от 1 юни 2008 г.

▼B

ПРИЛОЖЕНИЕ

▼M6

Забележка:

Преди някой от следните методи за изпитване да се използва за изпитване на вещество, включващо повече съставки (MCS), на вещество с неизвестен или променлив състав, продукт от сложна реакция или биологичен материал (UVCB), или на смес и когато приложимостта на метода за изпитване за изпитването на MCS, UVCB или смеси не е посочена в съответния метод за изпитване, следва да се разгледа дали този метод е адекватен за планираната регулаторна цел.

Ако методът за изпитване се използва за изпитване на MCS, UVCB или смес, следва да се предостави достатъчно информация относно нейния състав, доколкото е възможно, напр. химичната идентичност на съставките, количествения състав и относимите свойства на съставките.

▼B**ЧАСТ А: МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ФИЗИКОХИМИЧНИ СВОЙСТВА**

СЪДЪРЖАНИЕ

- A.1. ТЕМПЕРАТУРА НА ТОПЕНЕ/ЗАМРЪЗВАНЕ
- A.2. ТЕМПЕРАТУРА НА КИПЕНЕ
- A.3. ОТНОСИТЕЛНА ПЛЪТНОСТ
- A.4. НАЛЯГАНЕ НА ПАРИТЕ
- A.5. ПОВЪРХНОСТНО НАПРЕЖЕНИЕ
- A.6. РАЗТВОРИМОСТ ВЪВ ВОДА
- A.8. КОЕФИЦИЕНТ НА РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ
- A.9. ТОЧКА НА ВЪЗПЛАМЕНЯВАНЕ
- A.10. ЗАПАЛИМОСТ (ТВЪРДИ ВЕЩЕСТВА)
- A.11. ЗАПАЛИМОСТ (ГАЗОВЕ)
- A.12. ЗАПАЛИМОСТ (ПРИ КОНТАКТ С ВОДА)
- A.13. ПИРОФОРНИ СВОЙСТВА НА ТВЪРДИ ВЕЩЕСТВА И ТЕЧНОСТИ
- A.14. ЕКСПЛОЗИВНИ СВОЙСТВА
- A.15. ТЕМПЕРАТУРА НА САМОЗАПАЛВАНЕ (ТЕЧНОСТИ И ГАЗОВЕ)
- A.16. ОТНОСИТЕЛНА ТЕМПЕРАТУРА НА САМОЗАПАЛВАНЕ НА ТВЪРДИ ВЕЩЕСТВА
- A.17. ОКСИДИРАЩИ СВОЙСТВА (ТВЪРДИ ВЕЩЕСТВА)
- A.18. СРЕДНО БРОЙНО МОЛЕКУЛНО ТЕГЛО И РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА МОЛЕКУЛНОТО ТЕГЛО НА ПОЛИМЕРИ
- A.19. НИСКОМОЛЕКУЛНО ТЕГЛОВНО СЪДЪРЖАНИЕ НА ПОЛИМЕРИ
- A.20. ПОВЕДЕНИЕ НА РАЗТВАРЯНЕ/ЕКСТРАКЦИЯ НА ПОЛИМЕРИ ВЪВ ВОДА
- A.21. ОКСИДИРАЩИ СВОЙСТВА (ТЕЧНОСТИ)
- A.22. ПРЕТЕГЛЕНА СПРЯМО ДЪЛЖИНАТА СРЕДНОГЕОМЕТРИЧНА СТОЙНОСТ НА ДИАМЕТЪРА НА ВЛАКНА
- A.23. КОЕФИЦИЕНТ НА РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ (1-ОКТАНОЛ/ВОДА): МЕТОД НА БАВНО РАЗБЪРКВАНЕ
- A.24. КОЕФИЦИЕНТ НА РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ (N-ОКТАНОЛ/ВОДА), МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ С ВИСОКОЕФЕКТИВНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ (ВЕТХ)
- A.25. ДИСОЦИАЦИОННИ КОНСТАНТИ ВЪВ ВОДА (ТИТРИМЕТРИЧЕН МЕТОД — СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕН МЕТОД — КОНДУКТОМЕТРИЧЕН МЕТОД)

▼B**A.1. ТЕМПЕРАТУРА НА ТОПЕНЕ/ЗАМРЪЗВАНЕ****1. МЕТОД**

Повечето от описаните методи се основават на Ръководството за провеждане на изпитвания на ОИСП (1). Основните принципи са дадени в препратки (2) и (3).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Описаните методи и апаратура се прилагат за определяне на температурата на топене на веществата без никакви ограничения относно тяхната степен на чистота.

Изборът на метода зависи от природата на веществото, което трябва да се изследва. По тази причина ограничаващият фактор ще бъде свързан с това, дали веществото може да се приведе в прахообразно състояние (лесно или трудно) или не.

За някои вещества е по-подходящо да се определя температурата на замръзване или втвърдяване. Ето защо в този метод са включени стандарти и за тези определения.

Когато, поради по-особените свойства на веществото, определянето на гореспомнатите параметри е по-трудно, може да се определи точката на застиване.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Температурата на топене се определя като температурата, при която се извършва фазовият преход от твърдо към течно състояние при атмосферно налягане; тази температура напълно съответства на температурата на замръзване.

Фазовият преход при много вещества се извършва в температурен интервал, наричан „интервал на топене“.

Превръщане на мерните единици (К към °С)

$$t = T - 273,15$$

t: Целзиева температура, градус Целзий (°С)

T: термодинамична температура, Келвин (К)

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Не във всички случаи, когато се изследва ново вещество, е необходимо да се използват вещества за сравнение. Преди всичко те трябва да служат за периодична проверка на действието на метода и да позволяват сравнение с резултатите, получени по други методи.

Някои калибровъчни вещества са изброени в препратка (4).

▼B**1.4. ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАТЕЛНИЯ МЕТОД**

Определя се температурата (температурният интервал) на фазовия преход от твърдо към течно или от течно към твърдо състояние. На практика, когато се нагрява/охлажда проба от изследваното вещество при атмосферно налягане, се определят началната температура на топене/замръзване и температурата в последната фаза на топенето/замръзването. Описани са пет типа методи, а именно — капиларен метод, методи с горещи подложки, методи за определяне на температурата на замръзване, методи на термичния анализ и определяне на точката на застиване (разработен за нефтени масла).

В някои случаи е по-подходящо вместо температурата на топене да се измери температурата на замръзване.

1.4.1. Метод с капиларка**1.4.1.1. *Устройства за температура на топене с течностна баня***

Малко количество от фино стритото вещество се поставя в капиларка и се стръсква в плътна маса. Капиларката се нагрява заедно с термометър. Повишаването на температурата се регулира така, че да не надвишава 1 K/min по време на самото топене. Определят се началната и крайната температура на топене.

1.4.1.2. *Устройства за температура на топене с метален блок*

Както е описано в 1.4.1.1, но капиларката и термометърът са разположени в нагрят метален блок и могат да се наблюдават през отвори в блока.

1.4.1.3. *Отчитане с фотоклетка*

Пробата в капиларката се нагрява автоматично в метален цилиндър. С помощта на отвор в цилиндъра светлинен лъч се насочва през веществото към прецизно калибрирана фотоклетка. В процеса на топене оптичните свойства на повечето вещества се променят от непрозрачно към прозрачно. Интензитетът на светлината, която достига до фотоклетката, се увеличава и тя изпраща сигнал за спиране към цифровия индикатор, отчитащ температурата на платинов съпротивителен термометър, разположен в нагревателната камера. Този метод не е подходящ за някои силнооцветени вещества.

1.4.2. Горещи подложки**1.4.2.1. *Кофлеров апарат с гореща пръчка***

Кофлеровият апарат с гореща пръчка използва две парчета метал с различна топлопроводимост, нагрявани електрически, с пръчка, направена така, че температурният градиент да е почти линеен по дължината ѝ. Температурата на горещата пръчка може да се изменя по дължината и между 283 и 573 K се отчита със специално устройство, включващо плъзгач с показалец и етикети, направени специално за дадената пръчка. За да се определи температурата на топене, веществото се разстила на тънък пласт направо по повърхността на горещата пръчка. След няколко секунди се появява рязка разделителна линия между течната и твърдата фаза. Температурата на разделителната линия се отчита, като стрелката се нагласява да лежи върху нея.

▼B**1.4.2.2. *Микроскоп за стаяне***

Използват се няколко вида горещи масички за микроскопа, които служат за определяне на температурата на топене на съвсем малки количества от веществото. При повечето от горещите масички температурата се измерва с чувствителна термодвойка, но понякога се използват и живачни термометри. Типичният апарат за температура на топене с микроскоп с гореща масичка има нагревателна камера, съдържаща метална плочка, върху която пробата се поставя на стъкло. В центъра на металната плочка има отвор, през който навлиза светлината от осветителното огледало на микроскопа. Когато се използва, камерата е затворена със стъклена пластинка, така че да се изолира въздухът около пробата.

Нагряването на пробата се регулира с реостат. За много точни измервания на оптически анизотропни вещества може да се използва поляризирана светлина.

1.4.2.3. *Менискусен метод*

Този метод се използва специално за полиамиди.

Визуално се определя температурата, при която се измества менискусят от силиконово масло, поставено между горещата подложка и покривното стъкло, което се поддържа от пробния образец от полиамид.

1.4.3. **Метод за определяне на температурата на замръзване**

Пробата се слага в специална епруветка и се поставя в апарат за определяне на температурата на замръзване. По време на охлаждането пробата се разбърква внимателно без прекъсване, а температурата се измерва на подходящи интервали от време. Когато температурата остане постоянна при няколко последователни измервания, тази температура (коригирана с грешката на термометъра) се отчита като температура на замръзване.

Трябва да се избягва преохлаждането, като се поддържа равновесие между твърдата и течната фаза.

1.4.4. **Термичен анализ****1.4.4.1. *Диференциален термичен анализ (ДТА)***

При тази техника се прави запис на разликата в температурите на веществото и на сравнителния материал като функция от температурата, като веществото и сравнителният материал са подложени на една и съща контролирана температурна програма. Когато пробата претърпява преход, свързан с промяна на енталпията, тази промяна се проявява като ендотермично (топене) или екзотермично (замръзване) отклонение от основната линия на записа на температурата.

▼B1.4.4.2. *Диференциална сканираща калориметрия (ДСК)*

При тази техника се прави запис на разликата в подадената енергия към веществото и към сравнителния материал като функция от температурата, като веществото и сравнителният материал са подложени на една и съща контролирана температурна програма. Тази енергия представлява енергията, необходима да се установи нулева температурна разлика между веществото и сравнителния материал. Когато пробата претърпява преход, свързан с промяна на енталпията, тази промяна се регистрира като ендотермично (топене) или екзотермично (замръзване) отклонение от основната линия на записа на топлинния поток.

1.4.5. **Точка на застиване**

Този метод е разработен за нефтени масла и е подходящ за маслообразни вещества с ниски температури на топене.

След предварително нагряване пробата се охлажда с определена скорост и характеристиките ѝ на течливост се изследват на интервали от 3 К. Най-ниската температура, при която все още се наблюдава движение на веществото, се отчита като точка на застиване.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Приложимостта и точността на различните методи, които се използват за определяне на температурата на топене/интервала на топене, са дадени в следните таблици:

ТАБЛИЦА: ПРИЛОЖИМОСТ НА МЕТОДИТЕ

А. Капилярни методи

Метод за измерване	Вещества, които могат да се разпръсхват	Вещества, които се разпръсхват трудно	Температурен интервал	Оценка на точността ⁽¹⁾	Съществуващ стандарт
Устройства за температура на топене с водна баня	да	само в известна степен	от 273 до 573 К	± 0,3 К	JIS K 0064
Устройства за температура на топене с метален блок	да	само в известна степен	от 293 до > 573 К	± 0,5 К	ISO 1218 (E)
Отчитане с фотоклетка	да	няколко с допълнителни приспособления	от 253 до 573 К	± 0,5 К	

⁽¹⁾ Зависи от типа на апарата и степента на чистота на веществото.



Б. Методи с горещи подложки и методи със замразяване

Метод за измерване	Вещества, които могат да се разпрашават	Вещества, които се разпрашават трудно	Температурен интервал	Оценка на точността (1)	Съществуващ стандарт
Кофлер с гореща пръчка	да	не	от 283 до > 573 K	± 1K	ANSI/ASTM D 3451-76
Микроскоп за стапяне	да	само в известна степен	от 273 до > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Менискусен метод	не	специално за полиамиди	от 293 до > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Методи за температура на замръзване	да	да	от 223 до 573 K	± 0,5 K	например BS 4695

(1) Зависи от типа на апарата и степента на чистота на веществото.

В. Термичен анализ

Метод за измерване	Вещества, които могат да се разпрашават	Вещества, които се разпрашават трудно	Температурен интервал	Оценка на точността (1)	Съществуващ стандарт
Диференциален термичен анализ	да	да	от 173 до 1 273 K	до 600 K ± 0,5 K до 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Диференциална сканираща калориметрия	да	да	от 173 до 1 273 K	до 600 K ± 0,5 K до 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Зависи от типа на апарата и от степента на чистота на веществото.

Г. Точка на застиване

Метод за измерване	Вещества, които могат да се разпрашават	Вещества, които се разпрашават трудно	Температурен интервал	Оценка на точността (1)	Съществуващ стандарт
Точка на застиване	за нефтени масла и маслени субстанции	за нефтени масла и маслени субстанции	от 223 до 323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

(1) Зависи от типа на апарата и от степента на чистота на веществото.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДИТЕ

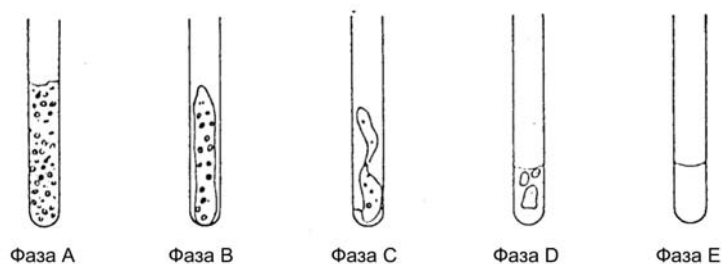
Процедурите на почти всички методи за изпитване са описани в международни и национални стандарти (вж. допълнение 1).

1.6.1. Методи с капилярна тръбичка

При бавно повишаване на температурата фино разпратените вещества обикновено преминават през фазите на топене, показани на фигура 1.

▼ B

Фигура 1



- Фаза А (Начало на топенето): фини капчици полепват равномерно по вътрешната стена на капилярката.
- Фаза В появява се просвет между пробата и вътрешната стена, който се дължи на свиване на стопилката.
- Фаза С свитата проба започва да се свлича надолу и да се втечнява.
- Фаза D на повърхността се образува напълно оформен менискус, но значително количество от пробата все още е в твърдо състояние.
- Фаза E (Крайна фаза на топенето): вече няма твърди частици.

При определяне на температурата на топене се отчитат температурата в началото на топенето и тази в крайната му фаза.

1.6.1.1. Прибори за определяне на температурата на топене в апарат с течностна баня

На фигура 2 е показан един тип стандартизиран апарат за температура на топене, изработен от стъкло (JIS K 0064); всички размери са в милиметри.

Фигура 2



▼B*Течност за банята:*

Трябва да се избере подходяща течност. Изборът на течността зависи от температурата на топене, която трябва да се определя: например течен парафин — за температури на топене не по-високи от 473 К, силиконово масло — за температури на топене не по-високи от 573 К.

За температури на топене над 523 К може да се използва смес, която се състои от три части сярна киселина и две части калиев сулфат (масово съотношение). Ако се използва такава течност, трябва да се вземат подходящи предпазни мерки.

Термометър:

Могат да се използват само такива термометри, които съответстват на изискванията на посочените по-долу или на еквивалентни стандарти:

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

Процедура на измерване:

Сухото вещество се стрива на фин прах в хаванче и се поставя в капилярка, запоена от едната страна, така че нивото на запълване да е приблизително 3 mm, след като веществото се сбие в плътна маса. За да се получи равномерно уплътнена проба, капилярката трябва да се пуска от височина около 700 mm през вертикална стъклена тръба върху часовниково стъкло.

Напълнената капилярка се поставя в банята, така че средната част на живачния резервоар на термометъра да се допира до нея в областта, където е разположена пробата. Обикновено капилярката се въвежда в апарата около 10 К преди да се достигне температурата на топене.

Течността в банята се нагрява по такъв начин, че покачването на температурата да е приблизително 3 K/min. Течността трябва да се разбърква. При около 10 К под очакваната температура на топене скоростта на покачване на температурата се регулира така, че да не надвишава 1 K/min.

Изчисления:

Температурата на топене се изчислява, както следва:

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

където:

T = коригираната температура на топене в К

T_D = температурата, отчетена по термометъра D в К

T_E = температурата, отчетена по термометъра E в К

n = броя деления на живачната нишка на термометър D при нивото на потапяне на ствола му.

1.6.1.2. *Уреди за измерване на температурата на топене в метален блок*

Апаратура

Тя се състои от:

— цилиндричен метален блок, чиято горна част е куха и образува камера (вж. фигура 3),

— метална запушалка с два или повече отвори, които позволяват капилярките да се монтират в металния блок,

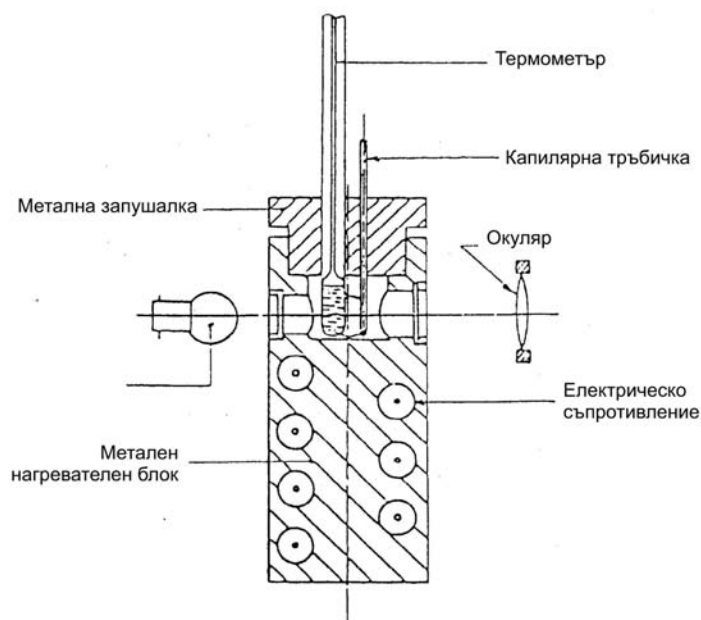
▼В

- нагревателна система за металния блок, осигурена например от електрическо съпротивление, включено в блока,
- реостат за регулиране на входното напрежение (ако се използва електрическо нагряване),
- четири прозорчета от термоустойчиво стъкло на страничните стени на камерата, диаметрално разположени и под прав ъгъл едно спрямо друго. Пред едно от тези прозорчета се монтира окуляр за наблюдение на капиларката. Другите три прозорчета се използват за осветяване на вътрешността на апарата с помощта на лампи,
- капиларка от термоустойчиво стъкло, запоена в единия край (вж. 1.6.1.1).

Термометър:

Вижте стандартите, посочени в 1.6.1.1. Могат да се прилагат и термоелектрически измервателни устройства със съпоставима точност.

Фигура 3

1.6.1.3. *Отчитане с фотоклетка**Апаратура и процедура:*

Апаратът се състои от метална камера с автоматична нагревателна система. Три капиларки се напълват, както е описано в 1.6.1.1, и се поставят в пещта.

▼B

Може да се направят няколко линейни покачвания на температурата за калибриране на апарата и подходящото температурно покачване се нагласява електрически на предварително подбрана постоянна линейна скорост. Записващите устройства показват действителната температура на пещта и температурата на веществото в капиларката.

1.6.2. Горещи подложки**1.6.2.1. Кофлер с гореща пръчка**

Вж. допълнението.

1.6.2.2. Топилен микроскоп

Вж. допълнението.

1.6.2.3. Менискусен метод (полиамиди)

Вж. допълнението.

Скоростта на нагряване при температурата на топене трябва да е по-ниска от 1 K/min.

1.6.3. Методи за определяне на температурата на замръзване

Вж. допълнението.

1.6.4. Термичен анализ**1.6.4.1. Диференциален термичен анализ**

Вж. допълнението.

1.6.4.2. Диференциална сканираща калориметрия

Вж. допълнението.

1.6.5. Определяне на точката на застиване

Вж. допълнението.

2. ДАННИ

В някои случаи е необходима корекция на термометъра.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

По възможност протоколът от изпитването трябва да включва следната информация:

— използван метод,

— точна спецификация на веществото (вид и примеси) и предварителни стъпки на пречистване, ако има такива,

— оценка на точността.

Като температура на топене се съобщава средноаритметичното от най-малко две измервания, които са в обхвата на оценката на точността (вж. таблиците).

▼B

Ако разликата в температурите на началната и крайната фаза на топенето е в границите на точността на метода, температурата в крайната фаза на топенето се приема за температура на топене на веществото; в другия случай трябва да се съобщят и двете температури.

Ако веществото се разлага или сублимира, преди да се достигне температурата на топене, трябва да бъде указана температурата, при която се наблюдава този ефект.

Всяка информация и бележки, свързани с интерпретацията на резултатите, трябва да се отразят в протокола, особено онези, които се отнасят до примесите и физичното състояние на веществото.

4. ПРЕПРАТКИ

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

▼B*Допълнение*

За допълнителни технически детайли може да се направи справка например със следните стандарти.

1. Капилярни методи**1.1. Приспособления за измерване на температурата на топене в течна баня**

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals (Стандартен метод за изпитване на относителната начална и крайна точка на топене и областите на топене на органични химикали)
BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range (Метод за определяне на точка на топене и/или интервал на топене)
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapilarverfahren (Определяне на интервала на топене на смоли по капилярен метод)
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products (Методи за изпитване на точката на топене на химически продукти)

1.2. Приспособления за измерване на температурата на топене в метален блок

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen (Визуално определяне на температурата на топене на частичнокристални пластмаси)
ISO 1218 (E)	Plastics — Polyamides — Determination of „melting point“ (Пластмаси — полиамиди — определяне на „точка на топене“)

2. Нагорещени подложки**2.1. Гореща пръчка на Кофлер**

ANSI/ASTM D 3451-76	Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings (Стандартни препоръчителни практики за изпитване на полимерни прахообразни покрития)
---------------------	---

2.2. Микроскоп за точка на топене

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen (Визуално определяне на температурата на топене на частичнокристални пластмаси)
-----------	---

2.3. Менискусен метод (полиамиди)

ISO 1218 (E)	Plastics — Polyamides — Determination of „melting point“ (Пластмаси — полиамиди — определяне на „точка на топене“)
--------------	--

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials (Стандартни характеристики на материали за шприцоване под налягане и екструдиране на основата на ацетални смоли)
NF T 51-050	Resines de polyamides. Determination du „point de fusion“. Methode du menisque (Полиамидни смоли. Определяне на „точка на топене“. Менискусен метод)

3. **Методи за определяне на температурата на замръзване**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point (Метод за определяне на точката на кристализация)
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve) (Метод за определяне на точката на топене на нефтен парафин (крива на охлаждане)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen (Определяне на точката на замръзване на авиационни бензини, автомобилни бензини и моторни бензоли)
ISO 2207	Cires de petrole: determination de la temperature de figeage (Нефтен восък: определяне на точката на замръзване)
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren (Определяне на точката на застиване на мастни киселини)
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines (Точка на топене на парафини)
NF T 20-051	Methode de determination du point de cristallisation (point de congélation) (Метод за определяне на точката на кристализация (точката на замръзване))
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point (Метод за определяне на точката на замръзване)

4. **Термичен анализ**

4.1. Диференциален термичен анализ

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis (Стандартен метод за оценка на термичната устойчивост на химикали чрез методите на диференциалния термичен анализ)
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis (Стандартни определения на термините, отнасящи се до термичния анализ)

▼B

	ASTM 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data (Стандартна практика за докладване на данни от термичния анализ)
	DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe (Термичен анализ. Основни понятия)
4.2.	Диференциална сканираща калориметрия	
	ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis (Стандартен метод за оценка на термичната устойчивост на химикали чрез методите на диференциалния термичен анализ)
	ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis (Стандартни определения на термините, отнасящи се до термичния анализ)
	ASTM 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data (Стандартна практика за докладване на данни от термичния анализ)
	DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe (Термичен анализ. Основни понятия)
5.	Определяне на точката на застиване	
	NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite — Monstememing en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
	ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils (Стандартен метод за определяне на точката на застиване на нефтени масла)
	ISO 3016	Petroleum oils — Determination of pour point. (Нефтени масла — определяне на точката на застиване)

▼B**A.2. ТЕМПЕРАТУРА НА КИПЕНЕ****1. МЕТОД**

Повечето от описаните методи се основават на Ръководството за провеждане на изпитвания на ОИСП (1). Основните принципи са дадени в препратки (2) и (3).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Описаните тук методи и апаратури могат да се прилагат за течности и нискотопими вещества, ако те не претърпяват химична реакция, преди да се достигне температурата им на кипене (например автоокисление, регрупировка, разграждане и др.). Методите могат да се прилагат за чисти и за непречистени течни вещества.

Акцентира се на методите, които използват отчитане с фото-клетка и термичен анализ, защото те позволяват да се определят както температурата на кипене, така и температурата на топене. Нещо повече, измерванията може да се извършват автоматично.

„Динамичният метод“ има това предимство, че може да се използва и за определяне на парното налягане, а и не е необходимо температурата на кипене да се коригира към нормално налягане (101,325 kPa), защото то може да се задава по време на измерването с маностат.

Забележки:

Влиянието, което примесите оказват върху определянето на температурата на кипене, зависи в голяма степен от природата на тези примеси. Когато в пробата има летливи примеси, които могат да повлияят на резултатите, веществото може да се пречисти.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Нормалната температура на кипене е температурата, при която налягането на наситените пари над течността е 101,325 kPa.

Ако температурата на кипене не се измерва при нормално атмосферно налягане, зависимостта на парното налягане от температурата може да се опише с уравнението на Клаузиус-Клапейрон:

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

където:

p = парното налягане на веществото в паскали

ΔH_v = неговата топлина на изпарение в J mol^{-1}

R = универсалната моларна газова константа = $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

T = термодинамичната температура в K

Температурата на кипене се определя спрямо външното налягане по време на измерването.

▼ B*Превръщане на мерните единици*

Налягане (единици: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(„bar“ все още е разрешена единица, но не се препоръчва)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(единиците „mm Hg“ и „Torr“ не са позволени)

1 atm = стандартна атмосфера = 101 325 Pa

(единицата „atm“ не е позволена)

Температура (единици: K)

$t = T - 273,15$

t: Целзиева температура, градус Целзий (°C)

T: термодинамична температура, Келвин (K)

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Не във всички случаи, когато се изследва ново вещество, е необходимо да се използват вещества за сравнение. Преди всичко те трябва да служат за периодична проверка на действието на метода, а също и да позволяват да се прави сравнение с резултатите, получени по други методи.

Някои калибровъчни вещества могат да бъдат намерени в методите, изброени в допълнението.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Пет от методите за определяне на температурата на кипене (интервала на кипене) се основават на измерване на температурата на кипене, останалите два метода се основават на термичен анализ.

1.4.1. Определяне с помощта на ебулиометър

Поначало ебулиометрите са предназначени за определяне на молекулното тегло по нарастването на температурата на кипене, но те също са подходящи и за точни измервания на самата температура на кипене. Един съвсем просто устроен апарат е описан в ASTM D 1120-72 (вж. допълнението). В този апарат течността се нагрява в равновесни условия при атмосферно налягане, докато започне да кипи.

1.4.2. Динамичен метод

Този метод включва измерване на температурата на повторна кондензация на парите с помощта на подходящ термометър в обратния хладник по време на кипенето. При този метод може да се изменя налягането.

1.4.3. Дестилационен метод за температура на кипене

Този метод включва дестилация на течността, измерване на температурата на повторна кондензация на парите и определяне на количеството на дестилата.

▼ **B**1.4.4. **Метод по Сиволобоф (Siwoloboff)**

Пробата се нагрява в епруветка, поставена в течността на нагревателна баня. В епруветката с пробата е потопена запоена капиллярка, която съдържа въздушно мехурче в долната си част.

1.4.5. **Отчитане с фотоклетка**

По принципа на Сиволобоф се провежда автоматично фотоелектрично измерване, като се използва увеличаващият се брой мехурчета.

1.4.6. **Диференциален термичен анализ**

При тази техника се прави запис на разликата в температурите на веществото и на сравнителния материал като функция от температурата, докато веществото и сравнителният материал са подложени на една и съща контролирана температурна програма. Когато пробата претърпява преход, свързан с промяна на енталпията, тази промяна се отбелязва като ендотермично отклонение (кипене) от основната линия на записа на температурата.

1.4.7. **Диференциална сканираща калориметрия**

При тази техника се прави запис на разликата в подадените енергии към веществото и към сравнителния материал като функция от температурата, докато веществото и сравнителният материал са подложени на една и съща контролирана температурна програма. Тази енергия представлява енергията, необходима да се установи нулева температурна разлика между изследваното вещество и сравнителния материал. Когато пробата претърпява преход, свързан с промяна на енталпията, тази промяна се отбелязва чрез ендотермично отклонение (кипене) от основната линия на записа на топлинния поток.

1.5. **КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО**

Приложимостта и точността на различните методи за определяне на температурата на кипене/интервала на кипене са дадени в таблица 1.

Таблица 1

Сравнение на методите

Метод на изпитване	Оценка на точността	Съществуващ стандарт
Ебулиометър	± 1,4 К (до 373 К) ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ± 2,5 К (до 600 К) ⁽¹⁾ ⁽²⁾	ASTM D 1120-72 ⁽¹⁾
Динамичен метод	± 0,5 К (до 600 К) ⁽²⁾	
Дестилационен процес (област на кипене)	± 0,5 К (до 600 К)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
По Сиволобоф	± 2 К (до 600 К) ⁽²⁾	
Отчитане с фотоклетка	± 0,3 К (при 373 К) ⁽²⁾	
Диференциална термична калориметрия	± 0,5 К (до 600 К) ± 2,0 К (до 1 273 К)	ASTM E 537-76
Диференциална сканираща калориметрия	± 0,5 К (до 600 К) ± 2,0 К (до 1 273 К)	ASTM E 537-76

⁽¹⁾ Тази точност е валидна само за опростен апарат, като например описания в ASTM D 1120-72; тя може да се подобри с по-усъвършенствани ебулиометрични прибори.

⁽²⁾ Валидна само за чисти вещества. Използването при други условия трябва да се оправдае.

▼ В**1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДИТЕ**

Начините на работа при някои от методите са описани в международни и национални стандарти (вж. допълнението).

1.6.1. Ебулиометър

Вж. допълнението

1.6.2. Динамичен метод

Вж. метод А.4 за определяне на парното налягане.

Записва се температурата на кипене, която се наблюдава при приложено налягане от 101,325 kPa.

1.6.3. Дестилационен процес (интервал на кипене)

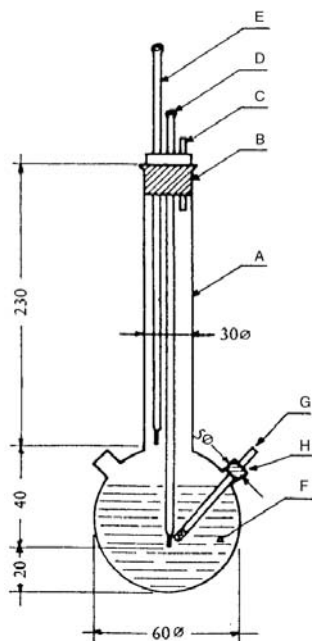
Вж. допълнението

1.6.4. Метод по Сиволобоф

Пробата се нагрява в апаратурата за определяне на температура на топене в епруветка с диаметър приблизително 5 mm (фигура 1).

На фигура 1 е показан един тип стандартизиран апарат за температури на топене и кипене (JIS K 0064) (направен от стъкло; всички размери са в милиметри).

Фигура 1



- A: Измервателен съд
 B: Запущалка
 C: Вентилационна тръбичка
 D: Термометър
 E: Спомагателен термометър
 F: Течност на банята
 G: Епруветка за пробата, максимум 5 mm
 външен диаметър; съдържа капилярка
 с дължина приблизително 100 mm;
 приблизителен вътрешен диаметър 1 mm
 и приблизителна дебелина на стената от
 0,2 до 0,3 mm
 H: Странична тръба

В тръбата за пробата се поставя капилярка (кипяща капилярка), запоена на разстояние около 1 cm над долния край. Нивото, до което се запълва с изследваното вещество, е такова, че запоената част на капилярката да се намира под повърхността на течността. Тръбата с пробата, съдържаща кипящата капилярка, се закрепва или към термометъра с гумена лента, или се фиксира с подпора отстрани (вж. фигура 2).



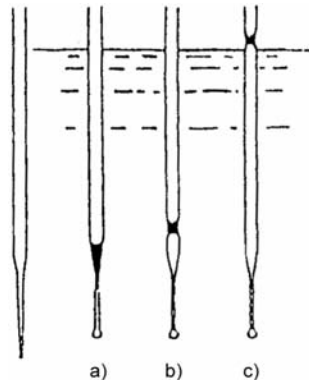
Фигура 2

Принцип по Сиволобоф



Фигура 3

Модифициран принцип



Течността за банята се избира според температурата на кипене. При температури до 573 K може да се използва силиконово масло. Течен парафин може да се използва само до 473 K. Отначало нагриването на течността в банята трябва да се нагласи така, че скоростта на повишаване на температурата да е 3 K/min. Течността на банята трябва да се разбърква. При около 10 K под очакваната температура на кипене нагриването се забавя, така че скоростта на повишаване на температурата да не надвишава 1 K/min. С приближаването до температурата на кипене от кипящата капилярка бързо започват да се появяват мехурчета.

Температурата на кипене е тази температура, когато при моментно охлаждане веригата от мехурчета се прекъсва и течността в капилярката започва внезапно да се покачва. Показанието на термометъра в този момент представлява температурата на кипене на веществото.

При модифицирания принцип (фигура 3) температурата на кипене се определя в капилярка за температура на топене. Капилярката се изтегля на дължина около 2 cm в единия край, така че да образува остър връх (а), и се засмуква малко количество от пробата. Отвореният край на изгънената капилярка се затваря чрез стопяване така, че в края да се разположи малко въздушно мехурче. При нагриването в апарата за температура на топене (b) въздушното мехурче се разширява. Температурата на кипене съответства на температурата, при която тапата, образувана от веществото над въздуха, достигне до нивото на течността на банята (с).

1.6.5. Отчитане с фотоклетка

Пробата се нагрива в капилярка във вътрешността на нагрят метален блок.

През подходящ отвор в блока се насочва светлинен лъч, който преминава през веществото и попада върху прецизно калибрирана фотоклетка.

В процеса на повишаване на температурата на пробата от кипящата капилярка се появяват единични въздушни мехурчета. Когато се достигне температурата на кипене, броят на мехурчетата нараства много. Това води до промяна в интензитета на светлината, регистрирана от фотоклетката, и изпраща сигнал за застопоряване на показанието на индикатора, който отчита температурата на платинов съпротивителен термометър, разположен в блока.

Този метод е особено подходящ, защото позволява измервания при температури под стайната до 253,15 K (- 20 °C), без да се налагат промени в апарата. Приборът просто трябва да се постави в охлаждаща баня.

▼B1.6.6. **Термичен анализ**1.6.6.1. *Диференциален термичен анализ*

Вж. допълнението.

1.6.6.2. *Диференциална сканираща калориметрия*

Вж. допълнението.

2. **ДАНИИ**

При малки отклонения от нормалното налягане (максимум ± 5 kPa), температурите на кипене се нормализират към T_n с числовото уравнение на Сидни Юнг:

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

където:

$$\Delta p = (101,325 - p) \text{ [отбележи знака]}$$

p = измереното налягане в kPa

f_T = скоростта на промяна на температурата на кипене с налягането в K/kPa

T = измерената температура на кипене в K

T_n = температурата на кипене, коригирана към нормално налягане в K

Коефициентите на температурната корекция, f_T и уравненията за тяхното приблизително определяне за много вещества са включени в споменатите по-горе международни и национални стандарти.

Например методът в DIN 53171 дава следните груби корекции за разтворители, включени в бои:

Таблица 2

Коефициенти за температурна корекция f_T

Температура T (K)	Корекционен коефициент f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B**3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

По възможност при отчитане на резултатите от изпитването трябва да се включи следната информация:

- използван метод,
- точна спецификация на веществото (вид и примеси) и предварителни етапи на пречистване, ако има такива,
- оценка на точността.

Като температура на кипене се съобщава средноаритметичното от най-малко две измервания, които са в границите на оценката на точността (вж. таблица 1).

Трябва да се укажат както измерените температури на кипене и тяхната средна стойност, така и налягането(ията) в kPa, при което(ито) са проведени измерванията. За предпочитане е наляганята да са близки до нормалното атмосферно налягане.

Цялата информация и бележките относно интерпретацията на резултатите трябва да се докладват и особено онези, които са свързани с примесите и физичното състояние на веществото.

4. ПРЕПРАТКИ

- (1) ОИСП, Paris, 1981, Test guideline 103, решение на Съвета C(81) 30 окончателен.
- (2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Burretworths, London, 1975, vol. II.
- (3) R. Weissberger edition: Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publications, New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VIII.



Допълнение

За допълнителни технически детайли може да се направи справка например със следните стандарти:

1. **Ебулиометър**
 - 1.1. Уреди за измерване на температурата на кипене с течна баня

ASTM D 1120-72	Standard test method for boiling point of engine anti-freezes (Стандартен метод за определяне на температурата на кипене на антифриз за двигатели)
----------------	--

2. **Дестилационен процес (интервал на кипене)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range) Метод за изпитване на дестилацията (дестилационен добив и дестилационен обхват)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products (Метод за определяне на дестилацията на нефтени продукти)
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics (Метод за определяне на дестилационни характеристики)
DIN 53171	Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes (Разтворители за лакобояджийски материали, определяне хода на дестилацията)
NF T 20-608	Distillation: determination du rendement et de l'intervalle de distillation (Дестилация: определяне на добива и на дестилационния интервал)

3. **Диференциален термичен анализ и диференциална сканираща калориметрия**

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis (Стандартен метод за оценка на термичната устойчивост на химикали чрез методите на диференциалния термичен анализ)
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis (Стандартни определения на термините, отнасящи се до термичния анализ)
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data (Стандартна практика за докладване на данни от термичен анализ)
DIN 51005	Thermische Analyse: Begriffe (Термичен анализ: основни понятия).



A.3. ОТНОСИТЕЛНА ПЛЪТНОСТ

1. МЕТОД

Описаните методи се основават на Ръководството за провеждане на изпитвания на ОИСР (1). Основните принципи са дадени в препратка (2).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Описаните методи за определяне на относителната плътност са приложими за твърди и течни вещества без всякакво ограничение с оглед на тяхната степен на чистота. Различните методи, които могат да се използват, са дадени в таблица 1.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Относителната плътност D_4^{20} на твърди вещества и течности представлява съотношението между масата на даден обем от веществото, което ще се изследва, определена при 20 °C, и масата на същия обем вода, определена при 4 °C. Относителната плътност е безразмерна величина.

Плътността на едно вещество „ ρ “ е частното на масата „ m “ и обема „ v “.

В системата SI плътността „ ρ “ се изразява в kg/m^3 .

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ (1) (3)

Не е необходимо да се използват вещества за сравнение във всички случаи, когато се изследва ново вещество. Преди всичко те трябва да служат за периодична проверка на действието на метода и да позволяват да се правят сравнения с резултатите, получени по други методи.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДИТЕ

Използват се четири класа методи.

1.4.1. Методи, основани на силата на изтласкване

1.4.1.1. *Ареометър* (за течни вещества)

Достатъчно точни и бързи измервания на плътността могат да се получат с плаващи ареометри, които позволяват плътността на дадена течност да се изчисли от дълбочината на потапяне по показанията на градуирана скала.

1.4.1.2. *Хидростатична везна* (за течни и твърди вещества)

За определяне на плътността може да се използва разликата в теглата на изследваната проба, измерени във въздуха и в подходяща течност (например вода).

За твърди вещества измерената плътност е представителна само за конкретната проба, с която е извършено измерването. За определяне на плътността на течности тяло с известен обем „ v “ се претегля отначало на въздуха и след това в течността.

1.4.1.3. *Метод с потопено тяло* (за течни вещества) (4)

При този метод плътността на дадена течност се определя от разликата в резултатите, получени при претеглянето на течността преди и след потапянето на тяло с известен обем в нея.

▼B**1.4.2. Пикнометрични методи**

За твърди вещества или течности могат да се използват пикнометри с различни форми и с известни обеми. Плътноста се изчислява от разликата в теглата на празния и пълния пикнометър и неговия известен обем.

1.4.3. Пикнометри с въздушно сравняване (за твърди вещества)

Плътноста на дадено твърдо вещество с произволна форма може да се измери при стайна температура с помощта на пикнометър с въздушно сравняване. Обемът на веществото се измерва на въздуха или в инертен газ в цилиндър с променлив калибриран обем. За да се изчисли плътността, след като приключи измерването на обема се прави едно измерване и на масата.

1.4.4. Осцилиращ денситометър (5) (6) (7)

Плътноста на дадена течност може да се измери с осцилиращ денситометър. Механичен осцилатор, конструиран под формата на U-образна тръба, се привежда в трептене при резонансната честота на осцилатора, която зависи от масата му. Въвеждането на проба променя резонансната честота на осцилатора. Апаратът трябва да се калибрира с помощта на две течности с известни плътности. Препоръчително е тези течни вещества да се подберат така, че плътностите им да покриват обхвата, в който ще се извършва измерването.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Приложимостта на различните методи, които се използват за определяне на относителната плътност, е показана в таблицата.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДИТЕ

В допълнението са дадени като примери стандарти, в които може да се направи справка за допълнителни технически подробности.

Изпитванията трябва да се извършват при 20 °C, като се правят поне по две измервания.

2. ДАННИ

Вж. стандартите.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

По възможност протоколът от изпитванията трябва да включва следната информация:

— използван метод,

— точна спецификация на веществото (вид и примеси) и предварителни етапи на пречистване, ако има такива.

Относителната плътност D_4^{20} трябва да се съобщава по начина, определен в 1.2, заедно с физичното състояние на измерваните вещества.

Цялата информация и бележките относно интерпретацията на резултатите трябва да се включат в протокола, особено онези, които са свързани с примесите и физичното състояние на веществото.



Таблица

Приложимост на методите

Метод на измерване	Плътност		Максимален възможен динамичен вискозитет	Съществуващи стандарти
	твърди вещества	течности		
1.4.1.1. Хидрометър		да	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Хидростатична везна				
а) твърди вещества	да			ISO 1183 (A)
б) течности		да	5 Pa s	ISO 901 и 758
1.4.1.3. Метод с потопено тяло		да	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Пикнометър				ISO 3507
а) твърди вещества	да			ISO 1183 (B) NF T 20-053
б) течности		да	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Пикнометър с въздушно сравняване	да			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4. Осцилиращ денситометър		да	5 Pa s	

4. ПРЕПАТКИ

- (1) ОИСП, Paris, 1981, Test Guideline 103, решение на Съвета C(81) 30 окончателен.
- (2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ. New York, 1959, vol. I, Part 1.
- (3) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and Applied Chemistry, 1976, vol. 48, 508.
- (4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol. 11, 427—430.
- (5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 297—302.
- (6) Baumgarten, D., Fullmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen — Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, 717-726.
- (7) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauerwissenschaft, 1976, vol. 9, 253—255.



Допълнение

За допълнителни технически детайли може да се направи справка например със следните стандарти:

1. **Методи със сила на изгласкване**
 - 1.1. **Ареометър**

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer; general instructions (Ареометър; основни инструкции);
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use (Част I: Ареометри за плътност: конструкция, настройка и употреба); Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation (Част II: Ареометри за плътност; стандартизирани размери, обозначаване); Part III: Use and test (Част III: Употреба и методи за изпитване).
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose (Лабораторна стъклария: ареометри с общо предназначение);
NF T 20-050	Chemical products for industrial use — Determination of density of liquids — Areometric method (Химични продукти за индустриална употреба — определяне плътността на течности — ареометричен метод);
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers (Лабораторна стъклария: широкообхватни хидрометри);
 - 1.2. **Хидростатична везна**

За твърди вещества

ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics (Метод А: Методи за определяне на плътността и относителната плътност на пластмаси с изключение на пенопластмаси);
NF T 20-049	Chemical products for industrial use — Determination of the density of solids other than powders and cellular products — Hydrostatic balance method (Химични продукти за индустриална употреба. Определяне плътността на твърди вещества с изключение на прахообразни и разпенени продукти — метод с хидростатична везна);
ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement (Относително тегло и плътност на пластмаси чрез изместване);
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers; determination of density (Изследване на пластмаси и еластомери; определяне на плътността);

За течни вещества

ISO 901	ISO 758
---------	---------

▼B

	DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density (Изпитване на минерални масла и свързани с тях материали; определяне на плътността);
	ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 и ASTM D 1481-62	
	ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method (Плътност, специфично тегло или API относително тегло на суров нефт и течни нефтени продукти чрез хидрометричен метод);
	BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method (Плътност, специфично тегло или API относително тегло на суров нефт и течни нефтени продукти чрез хидрометричен метод);
1.3.	Метод с потопено тяло	
	DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method (Изпитване на бои, лакове и подобни материали за покрития; определяне на плътността; метод с потопено тяло)
2.	Пикнометрични методи	
2.1.	За течни вещества	
	ISO 3507	Pycnometers (Пикнометри);
	ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C (Течни химични продукти; определяне на плътността при 20 °C);
	DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous) (Пикнометър на Гей-Люсак (за нелетливи течности, които не са много вискозни));
	DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ at 15 °C) (Пикнометър на Липкин (за течности с кинематичен вискозитет, по-малък от $100 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ при 15 °C));
	DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798) (Пикнометър на Шпренгел (за течности както в DIN 12798));
	DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C) (Пикнометър на Райшауер (за течности с кинематичен вискозитет по-малък от $100 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ при 20 °C, приложим по-специално също и за въглеродороди и водни разтвори, както и за течности с по-високо налягане на парите, приблизително 100 kPa при 90 °C));

▼B

DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have too high a vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen) (Пикнометър на Хубард (за вискозни течности от всички типове, които нямат много високо налягане на парите, по-специално също и за бои, лакове и битуми));
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801) (Пикнометър на Бингам (за течности както в DIN 12801));
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol — water mixture) (Пикнометър на Йолм (по-специално за смес етанол— вода));
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous) (Пикнометър с вграден термометър и странична капилярна тръбичка (за течности, които не са твърде вискозни));
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer (Изпитване на бои, лакове и подобни продукти; определяне на плътността чрез пикнометър);
DIN 51757	Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density (Точка 7: Изследване на минерални масла и свързаните с тях продукти; определяне на плътността);
ASTM D 297	Section 15: Rubber products — chemical analysis (Част 15: Каучукови продукти — химичен анализ);
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds (Метод C: Халогенирани органични съединения);
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method) (Метод за определяне на специфичното тегло и плътността на нефтени продукти (метод с градуиран двукапилярен пикнометър);
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary — stoppered pycnometer method (Метод за определяне на относителната плътност и плътността на нефтени продукти с капилярка — метод със запушен пикнометър);
NF T 20-053	Chemical products for industrial use — Détermination of density of solids in powder and liquids — Pycnometric method (Химични продукти за индустриална употреба — определяне на плътността на твърди вещества в прахове и течности — пикнометричен метод);

▼B

2.2. За твърди вещества

ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics (Метод В: Методи за определяне на плътността и относителната плътност на пластмаси с изключение на разпенени пластмаси);
NF T 20-053	Chemical products for industrial use — Détermination of density of solids in powder and liquids — Pycnometric method (Химични продукти за индустриална употреба — определяне на плътността на твърди вещества в прахове и течности — пикнометричен метод);
DIN 19683	Determination of the density of soils (Определяне на плътността на почви)

3. **Пикнометър с въздушно сравняване**

DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte (Част 3: Изпитване на лакове и бои и подобни материали за покрития; прахообразен лак; определяне на плътността);
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung (Лакобояджийски материали; хлорсъдържащи полимери; изпитване).

▼ M1

A.4. НАЛЯГАНЕ НА ПАРИТЕ

1. МЕТОД

Този метод е еквивалентен на OECD TG 104 (2004).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Този преразгледан вариант на метод A.4 (1) включва един допълнителен метод; ефузионен метод; изотермична термогравиметрия, предназначена за вещества с много ниски налягания на парите (до 10^{-10} Pa). С оглед на необходимостта от методика, поспециално по отношение на определянето на налягането на парите при вещества с ниско налягане на парите, се оценяват още веднъж други методики за този метод по отношение на други интервали на приложимост.

В условията на термодинамично равновесие налягането на парите на чистото вещество зависи само от температурата. Основните принципи са описани в (2) и (3).

Единствена методика за измерване, приложима за целия обхват на налягания на парите от под 10^{-10} до 10^5 Pa, не съществува. Този метод включва осем метода за измерване на налягането на парите, които могат да се прилагат в различни обхвати от парни налягания. В таблица 1 различните методи са сравнени по отношение на обхватите на прилагането им и измерването. Методите могат да бъдат прилагани за съединения, които не се разлагат при условията на изследването. В случаите, в които експерименталните методи не могат да бъдат приложени по технически причини, налягането на парите може да бъде оценено, като препоръчителният метод за оценка е даден в допълнението.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Налягане на парите на вещество е налягането на наситените пари над твърдо или течено вещество.

Трябва да се използва единицата за налягане по SI, която е паскал (Pa). По-долу са дадени други мерни единици, които са използвани в миналото, заедно с техните коефициенти на преобразуване:

$$1 \text{ Torr} = 1 \text{ mm Hg} = 1,333 \times 10^2 \text{ Pa}$$

$$1 \text{ атмосфера} = 1,013 \times 10^5 \text{ Pa}$$

$$1 \text{ bar} = 10^5 \text{ Pa}$$

Единицата за температура по SI е Келвин (K). Преобразуването на градуси по Целзий в келвини се извършва по формулата.

$$T = t + 273,15$$

където T е келвиновата температура или абсолютната температура в келвини, а t е температурата, изразена в градуси по Целзий.



Таблица 1

Метод на измерване	Вещества		Оценка повтo-ряемост	Оценка възпро-изводимост	Препоръчителен обхват
	твърди	течни			
Динамичен метод	Нискотопими	Да	до 25 % от 1 до 5 %	до 25 % от 1 до 5 %	от 10^3 Pa до 2×10^3 Pa от 2×10^3 Pa до 10^5 Pa
Статичен метод	Да	Да	от 5 до 10 %	от 5 до 10 %	от 10 Pa до 10^5 Pa от 10^{-2} Pa до 10^5 Pa ⁽¹⁾
Метод на изоте-нископа	Да	Да	от 5 до 10 %	от 5 до 10 %	от 10^2 Pa до 10^5 Pa
Ефузионен метод: везна за измерване на налягането на парите	Да	Да	от 5 до 20 %	до 50 %	от 10^{-3} до 1 Pa
Ефузионен метод: Кнуд-сенова клетка	Да	Да	от 10 до 30 %	—	от 10^{-10} до 1 Pa
Ефузионен метод: изотермична термогравиметрия	Да	Да	от 5 до 30 %	до 50 %	от 10^{-10} до 1 Pa
Метод с насищане на газ	Да	Да	от 10 до 30 %	до 50 %	от 10^{-10} до 10^3 Pa
Метод с въртящ се ротор	Да	Да	от 10 до 20 %	—	от 10^{-4} до 0,5 Pa

(¹) При използване на капацитивен манометър.

1.3. ПРИНЦИП НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

В общия случай налягането на парите се определя при различни температури. В ограничен температурен интервал логаритъмът от налягането на парите на дадено чисто вещество е линейна функция на реципрочната стойност на абсолютната температура в съответствие с уравнението на Клапейрон—Клаузиус:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2,3RT} + C^{te}$$

където:

p = налягането на парите в паскали

ΔH_v = скритата топлина на изпарение в $J \text{ mol}^{-1}$

R = универсалната газова константа, $8,314 J \text{ mol}^{-1} K^{-1}$

T = температурата в K

▼ M1

1.4. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

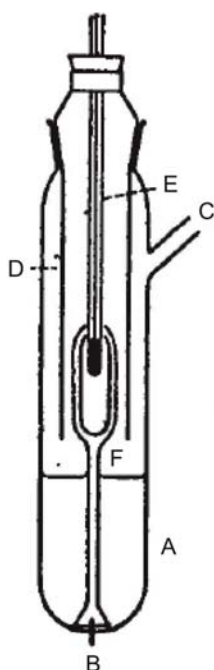
Не е необходимо да се използват вещества за сравнение. Преди всичко те служат за периодична проверка на действието на метода, както и да позволят сравнение на резултатите, получени по различни методи.

1.5. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

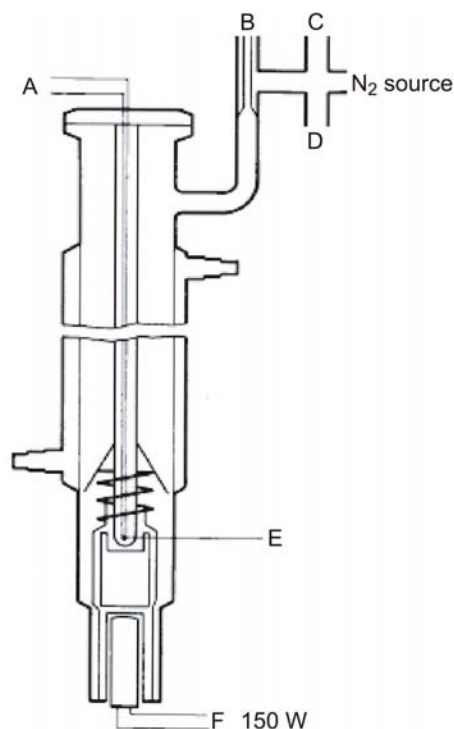
1.5.1. **Динамичен метод (метод на Котрел)**1.5.1.1. *Принцип*

Налягането на парите се определя, като се измери температурата на кипене на веществото при няколко определени налягания, грубо между 10^3 и 10^5 Pa. Този метод се препоръчва и за определяне на температурата на кипене. Той е подходящ за тази цел до 600 K. На дълбочина от 3 до 4 cm температурите на кипене на течностите са приблизително с $0,1$ °C по-високи отколкото на повърхността поради хидростатичното налягане на стълба течност. При метода на Котрел (4) термометърът е поставен в парите над повърхността на течността и кипящата течност се принуждава непрекъснато да се самоизпомпва над резервоара на термометъра. Резервоарът е покрит с тънък слой течност, който при атмосферно налягане е в равновесие с парите. Така термометърът отчита действителната температура на кипене без грешки, дължащи се на прегряване или на хидростатичното налягане. Използваната първоначално от Котрел помпа е показана на фигура 1. Кипящата течност се съдържа в тръбата A. Равномерното кипене е улеснено от платинената тел B, захваната към дъното. Страничната тръба C води към кондензатор, а обвивката D пречи на студения кондензат да достига термометъра E. Когато течността A кипи, през двата клона на помпата F над резервоара на термометъра преминават мехурчета и течност.

Фигура 1



Фигура 2



▼ M1

Помпа на Котрел (4)

A: Термодвойка

B: Вакуумен буферен обем

C: Манометър

D: Вакуум

E: Точка на измерване

F: Нагревател около 150 W

1.5.1.2. *Апаратура*

На фигура 2 е показан много точен уред, използващ принципа на Котрел. Той се състои от тръба със зона на кипене в долната част, охладител в средната част и изпускателен канал и фланец в горната част. Помпата на Котрел е разположена в зоната на кипене, която се нагрява с електрически елемент. Температурата се измерва с термодвойка в защитна обвивка или със съпротивителен термометър, който се вкарва през фланеца най-горе. Изпускателният канал е свързан към системата за регулиране на налягането. Последната се състои от вакуумпомпа, буферен обем, маностат за подаване на азот за регулиране на налягането и манометър.

1.5.1.3. *Методика*

Веществото се поставя в зоната на кипене. Проблеми могат да възникнат с веществата, които не са в прахообразно състояние, но в някои случаи те могат да се решат, като се нагрее охлаждащият кожух. Апаратът се затваря плътно с фланеца и веществото се дегазира. С този метод не могат да се измерват вещества, които образуват пяна.

След това се задава най-ниското желано налягане и се включва нагряването. В същото време температурният датчик се свързва със записващо устройство.

Равновесието е достигнато, когато при постоянно налягане се отчита една и съща температура на кипене. Трябва да се внимава много кипенето да не става на тласъци. Освен това в охладителя трябва да се извършва пълна кондензация на парите. Когато се определя налягането на парите на нискотопими твърди вещества, трябва да се вземат мерки да не се блокира кондензаторът.

След като се регистрира тази равновесна точка, се задава по-високо налягане. Процесът продължава по този начин до достигане на налягане от 10^5 Pa (приблизително от 5 до 10 измервателни точки общо). За проверка равновесните точки трябва да се повторят и при намаляване на налягането.

1.5.2. **Статичен метод**

1.5.2.1. *Принцип*

При статичния метод (5) налягането на парите при термодинамично равновесие се определя за дадена температура. Този метод е подходящ за вещества и многокомпонентни течности, както и за твърди тела в обхвата от 10 до 10^5 Pa и ако се внимава, също и в обхвата от 10^{-1} до 10 Pa.

▼ M1

1.5.2.2. Апаратура

Оборудването се състои от термостатирана вана (точност $\pm 0,2$ K), контейнер за пробата, свързан към вакуумна линия, манометър и система за регулиране на налягането. Камерата за проби (фигура 3а) е свързана към вакуумната линия през клапан и диференциален манометър (U-образна тръба, съдържаща подходяща манометрична течност), който служи за нулев индикатор. В зависимост от обхвата на налягането и химичните процеси с веществото в U-образната тръба могат да бъдат използвани живак, силикони и фталати. По екологични съображения обаче, ако е възможно, употребата на живак трябва да се избягва. Изпитваното вещество не бива да се разтваря забележимо или да реагира с течността в U-образната тръба. Вместо U-образна тръба може да се използва манометър (фигура 3б). За обхвата от нормално налягане до 10^2 Pa в манометъра може да се използва живак, докато силиконовите течности и фталатите са подходящи под 10^2 Pa до 10 Pa. Съществуват други манометри, които могат да се използват под 10^2 Pa, а под 10^{-1} Pa могат да бъдат използвани дори кондензивни манометри с нагриваща се мембрана. Температурата се измерва върху външната стена на съда, съдържащ пробата, или вътре в самия съд.

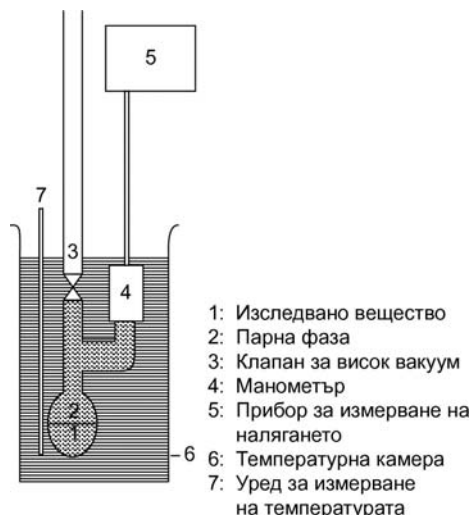
1.5.2.3. Методика

При използване на апарата в съответствие с фигура 3а U-образната тръба се напълва с избраната течност, която трябва да се дегазира при повишена температура, преди да започне отчитането. Изпитваното вещество се поставя в апарата и се дегазира при понижена температура. В случая на многокомпонентна проба температурата трябва да бъде достатъчно ниска, за да се гарантира, че съставът на материала не се променя. Равновесие може да се установи по-бързо чрез разбъркване. Пробата може да се охлажда с течен азот или сух лед, но трябва да се внимава да се избегне кондензацията на въздуха или на помпената течност. Клапанът над съда с пробата се отваря и в продължение на няколко минути се извършва засмукване, за да се отстрани въздухът. Ако е необходимо, операцията по дегазирането трябва да се повтори няколко пъти.

Фигура 3а



Фигура 3б



▼ M1

Когато пробата се нагрява при затворен клапан, налягането на парите се увеличава. Това променя равновесието на течността в U-образната тръба. За да се компенсира тази промяна, в апарата през клапан се подава азот или въздух, докато диференциалният индикатор на налягане се върне в нулево положение. Необходимо за целта налягане може да се отчете от манометъра или от измервателен уред с по-голяма точност. Това налягане съответства на налягането на парите на веществото при дадената температура на измерване. При използване на апарата от фигура 3б налягането на парите се отчита директно.

Налягането на парите се определя през подходящи малки интервали (приблизително от 5 до 10 измервателни точки общо) до достигане на желаната максимална температура.

За проверка отчитането при ниски температури трябва да се повтори. Ако стойностите, получени при това повторно отчитане, не съвпадат с кривата, получена при повишаване на температурата, това може да се дължи на една от следните причини:

- i) пробата все още съдържа въздух (например при високовискозни материали) или нискокипящи вещества, които се отделят при нагряването;
- ii) веществото претърпява химична реакция в изследвания температурен интервал (например разграждане, полимеризация).

1.5.3. Метод на изотенископа**1.5.3.1. Принцип**

Изотенископът (6) се основава на принципа на статичния метод. Методът включва поставяне на проба в колба, поддържана при постоянна температура и свързана към манометър или вакуум-помпа. По-летливите примеси на веществото се отстраняват чрез дегазиране при намалена температура. Налягането на парите на пробата при избрани температури се уравнива от известно по стойност налягане на инертен газ. Изотенископът е разработен за измерване на налягане на пари на определени течни въглеводороди, но може да се използва и за изследване на твърди вещества. Методът обикновено не е подходящ за многокомпонентни системи. Резултатите включват само малки грешки при проби, съдържащи нелетливи примеси. Препоръчителният обхват е от 10^2 до 10^5 Pa.

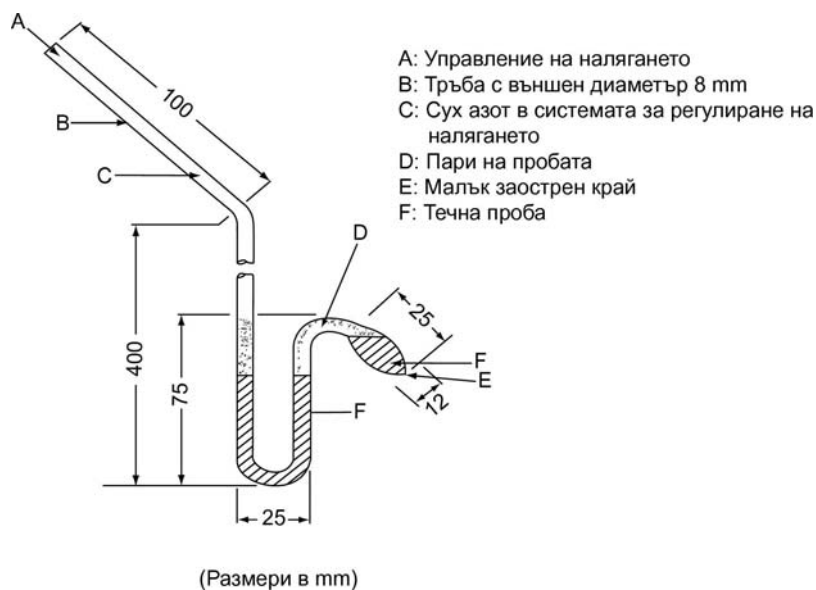
1.5.3.2. Апаратура

Пример за измервателен уред е показан на фигура 4. Можете да намерите пълно описание в ASTM D 2879—86 (6).

▼ **M1**1.5.3.3. *Методика*

Когато се изпитват течности, самото вещество служи за флуид в диференциалния манометър. В изотенископа се поставя количество течност, достатъчно да запълни резервоара и късия клон на манометъра. Изотенископът се прикачва към система за вакуум и се евакуира, след което се напълва с азот. Евакуирането и прочистването на системата се повтарят два пъти, за да се отстрани остатъчният кислород. Така напълненият изотенископ се поставя в хоризонтално положение, така че пробата да се разстели в тънък слой в резервоара за пробата и в манометъра. Налягането на системата се намалява до 133 Pa и пробата внимателно се нагрява до прага на закипяване (отстраняване на разтворените газове). След това изотенископът се поставя в такова положение, че пробата да се върне в резервоара и да изпълни късия клон на манометъра. Налягането се поддържа на 133 Pa. Заостреният край на резервоара за пробата се нагрява на малък пламък, докато отделената от пробата пара се разшири достатъчно, за да измести част от пробата в горната част на резервоара и в клона на манометъра в посока към манометричната зона, като по този начин се създава изпълнено с пари и свободно от азот пространство. След това изотенископът се поставя в термостатирана вана и налягането на азота се регулира, докато се изравни с това на пробата. При равновесие налягането на азота е равно на налягането на парите на веществото.

Фигура 4



При твърди вещества в зависимост от обхвата от налягания и температури се използват манометрични течности, като силиконови флуиди или фталати. Дегазираната течност на манометъра се помества в едно разширение върху дългото рамо на изотенископа. След това твърдото вещество, което ще бъде изследвано, се поставя в резервоара и се дегазира при повишена температура. После изотенископът се накланя така, че течността в манометъра да навлезе в U-образната тръба.

▼ **M1**1.5.4. **Ефузионен метод: везна за измерване на налягането на парите (7)**1.5.4.1. *Принцип*

Проба от изпитваното вещество се загрева в малка печ и се поставя в евакуиран стъклен звънец. Пещта е покрита с капак, в който има малки отвори с известни диаметри. Парите на веществото, които се пропускат през един от отворите, се насочват към блюдо на везна с голяма чувствителност, която също е затворена в евакуирания стъклен звънец. При някои постановки блюдото на везната се намира в хладилна камера, осигуряваща разсейване на топлината навън чрез топлопроводност, като блюдото се охлажда чрез лъчист топлообмен, така че изпусканияте пари кондензират върху него. Въздействието от струята на парите създава усилие върху везните. Налягането на парите може да се намери по два начина: пряко от силата върху блюдото, а също и от скоростта на изпаряване по формулата на Херц—Кнудсен (2):

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

където:

G = скоростта на изпаряване ($\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-2}$)

M = моларната маса (g mol^{-1})

T = температурата (K)

R = универсалната газова константа ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)

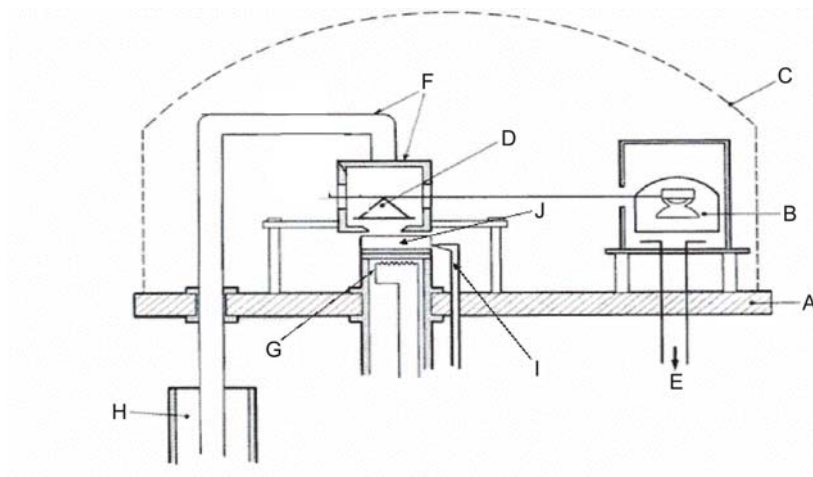
P = налягането на парите (Pa)

Препоръчителният обхват е от 10^{-3} до 1 Pa.

1.5.4.2. *Апаратура*

Основният принцип на апаратурата е показан на фигура 5.

Фигура 5



A:	Опорна плоча	F:	Хладилна камера и охлаждаща шина
B:	Измервателен уред от магнетоелектричната система	G:	Изпарителна пещ
C:	Стъклен звънец	H:	Дюаров съд с течен азот
D:	Везна с блюдо	I:	Измерване на температурата на пробата
E:	Устройство за измерване на подналягане	J:	Изследвано вещество

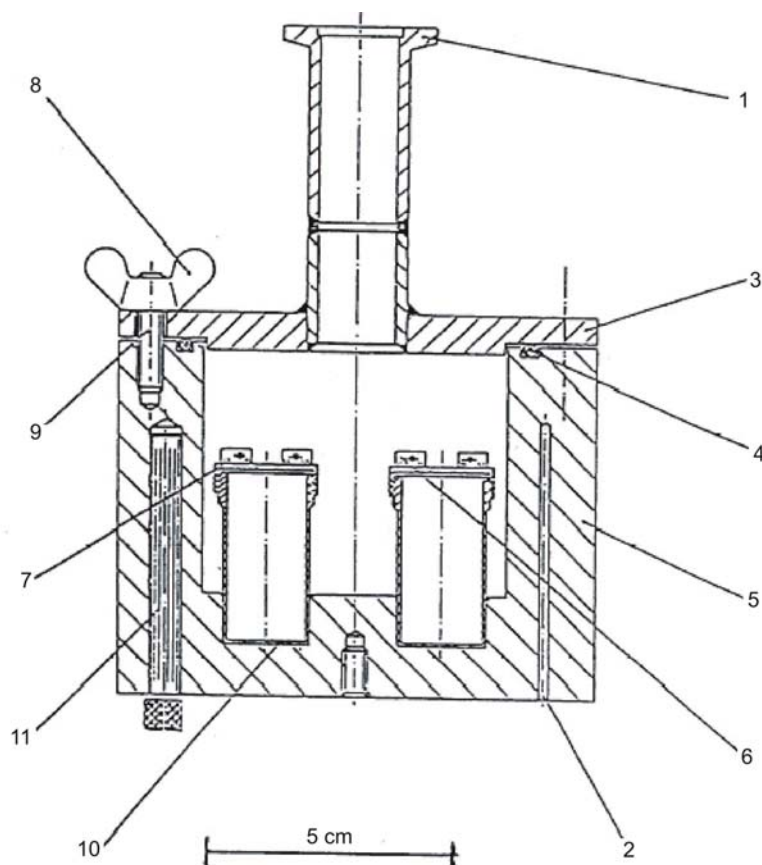
▼ **M1**1.5.5. **Ефузионен метод: Кнудсенова клетка**1.5.5.1. *Принцип*

Методът се основава на измерване на масата от изпитваното вещество, която изтича под формата на пари за единица време от Кнудсенова клетка (8) през микроотверстие в условията на свръхвакуум. Масата на изпуснатите пари може да се получи или като се определи загубата на маса от клетката, или чрез кондензация на парите при ниска температура и определяне на количеството на изпареното вещество, като се използва хроматографски анализ. Налягането на парите се изчислява чрез прилагане на зависимостта на Херц—Кнудсен (вж. точка 1.5.4.1) с корекционни коефициенти, които зависят от параметрите на апаратурата (9). Препоръчителният обхват е от 10^{-10} до 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. *Апаратура*

Основният принцип на апаратурата е показан на фигура 6.

Фигура 6



- | | | | |
|----|---|-----|--|
| 1: | Връзка към вакуума | 7: | Капак с резба |
| 2: | Гнезда за платинов съпротивителен термометър или за следене и регулиране на температурата | 8: | Крилчати гайки |
| 3: | Капак за вакуумния резервоар | 9: | Болтове |
| 4: | О-пръстен | 10: | Ефузионни клетки от неръждаема стомана |
| 5: | Алуминиев вакуумен резервоар | 11: | Нагревателен елемент |
| 6: | Устройство за монтиране и изваждане на ефузионните клетки | | |

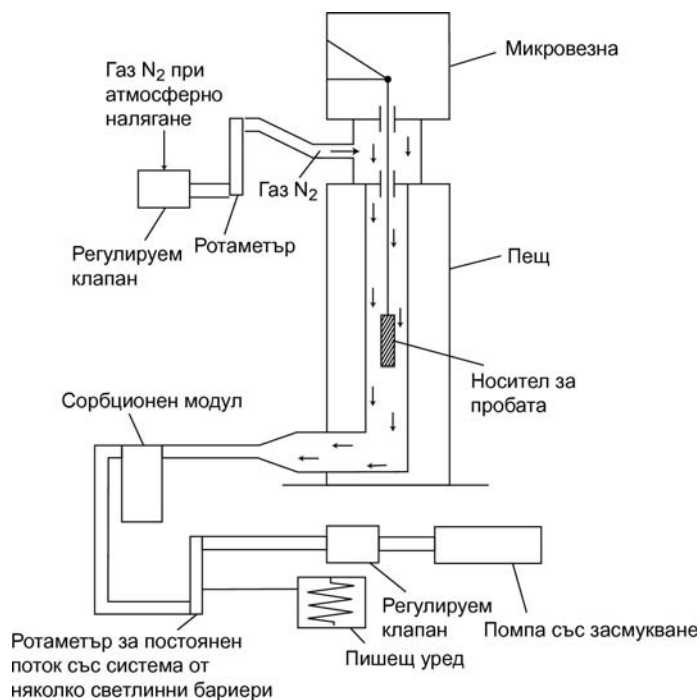
▼ **M1**1.5.6. **Ефузионен метод: изотермична термогравиметрия**1.5.6.1. *Принцип*

Този метод се основава на определянето на повишени скорости на изпаряване на изследваното вещество при повишени температури и атмосферно налягане чрез използване на термогравиметрия (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Скоростите на изпаряване v_T се определят чрез излагане на избраното съединение на бавен поток от инертен газ и следене на намаляването на теглото при определени фиксирани температури T (в келвини) през съответни интервали от време. Наляганията на парите p_T се изчисляват въз основа на стойностите v_T , като се използва линейната зависимост между логаритъма на налягането на парите и логаритъма на скоростта на изпаряване. Ако е необходимо, може да се извърши екстраполиране за температури 20 и 25 °C чрез регресионен анализ на $\log p_T$ като функция на $1/T$. Този метод е подходящ за вещества с ниски налягания на парите като 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) и с чистота възможно най-близка до 100 %, за да се избегне неточно тълкуване на измерените намалявания на теглото.

1.5.6.2. *Апаратура*

Основният принцип на опитната постановка е показан на фигура 7.

Фигура 7



Плочата с пробата, висяща на микровезна в камера с регулиране на температурата, се обдухва със струя от сух газ азот, който отнася изпарените молекули от изследваното вещество. След напускане на камерата газовата струя се пречиства в сорбционен модул.

1.5.6.3. *Методика*

Изследваното вещество се нанася върху повърхността на матирана стъклена плоча под формата на хомогенен слой. В случая на твърди материали плочата се намокря равномерно с разтвор на веществото в подходящ разтворител и се изсушава в инертна атмосфера. За измерването плочата с покритието се окачва в термогравиметричния анализатор, след което теглото непрекъснато се измерва във функция от времето.

▼ M1

Скоростта на изпаряване v_T при определена температура се изчислява въз основа на намаляването на теглото Δm на плочата с пробата по формулата:

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

където F е площта на покритието от изследваните вещества — обикновено площта на плочата с пробата, а t е времето за намаляване на теглото с Δm .

Налягането на парите p_T се изчислява въз основа на зависимостта му от скоростта на изпаряване v_T :

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

където C и D са константи, специфични за използваната опитна постановка, които зависят от диаметъра на измервателната камера и от дебита на газа. Тези константи трябва да бъдат определени еднократно чрез измерване на набор от съединения с известно налягане на парите и регресионен анализ на $\log p_T$ като функция на $\log v_T$ (11)(21)(22).

Зависимостта между налягането на парите p_T и температурата в градуси по Келвин се дава от:

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

където A и B са константи, които се получават чрез регресионен анализ на $\log p_T$ като функция на $1/T$. По тази формула налягането на парите може да бъде изчислено за всяка друга температура чрез екстраполация.

1.5.7. **Метод с насищане на газ (23)**1.5.7.1. *Принцип*

При стайна температура и известен дебит инертен газ се пропуска през или над проба от изследваното вещество достатъчно бавно, за да се осигури насищане. Постигането на насищане в газовата фаза е от критично значение. Пренасяното вещество се улавя в общия случай чрез сорбент и се определя количеството му. Алтернатива на улавянето на парите и последващия им анализ са аналитичните методи с непрекъснат характер (като газовата хроматография), които могат да се използват за определяне на количеството на пренасяното вещество. Налягането на парите се изчислява, като се приема, че е в сила законът за идеалния газ и че общото налягане на газова смес е равно на сумата от наляганята на участващите в сместа газове. Парциалното налягане на изследваното вещество, т.е. налягането на парите, се изчислява въз основа на известния общ газов обем и теглото на пренасяното вещество.

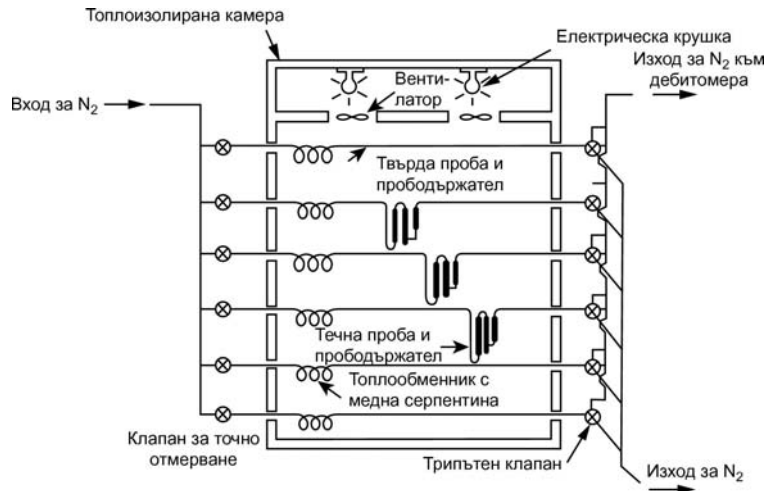
Методиката с насищане на газ е приложима за твърди и течни вещества. Тя може да се използва за наляганя на парите до минимум 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Методът е най-надежден за наляганя на парите под 10^3 Pa. Над 10^3 Pa за наляганя на парите по принцип се определят завишени стойности, вероятно поради образуването на аерозол. Тъй като измерванията на налягането на парите се извършват при стайна температура, не е необходимо екстраполиране на данни от високи температури и екстраполацията от високи температури, която често води до сериозни грешки, е избегната.

1.5.7.2. *Апаратура*

Методиката изисква използване на камера с постоянна температура. Скицата на фигура 3 представлява камера, съдържаща три прободържателя за твърди проби и три прободържателя за течни проби, които позволяват трикратен анализ на твърда или течна проба. Температурата се регулира с точност $\pm 0,5$ °C или по-висока.

▼ M1

Фигура 8



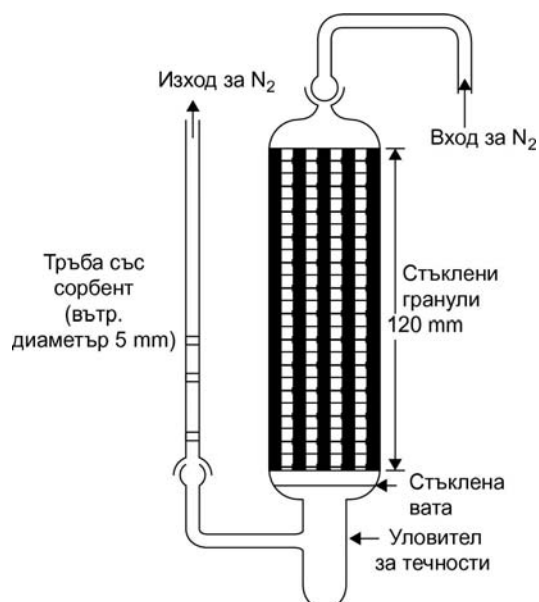
В общия случай като инертен газ носител се използва азот, но в някои случаи може да е необходимо да се използва друг газ (24). Газът носител трябва да бъде сух. Газовият поток се разделя на 6 потока, управлявани с иглени клапани (диаметър на отвора приблизително 0,79 mm), и навлиза в камерата през медна тръба с вътрешен диаметър 3,8 mm. След изравняване на температурата газът преминава през пробата и уловителя със сорбента и излиза от камерата.

Твърдите проби се зареждат в стъклена тръба с вътрешен диаметър 5 mm между запущалки от стъклена вата (вж. фигура 9). На фигура 10 е показан прободържател за течна проба и система от сорбенти. Най-възпроизводимият метод за измерване на налягането на парите на течност е да се разпредели течността върху стъклени гранули или върху инертен сорбент, като например кварц, и да се запълни прободържателят с тези гранули. Като алтернативен вариант газът носител може да бъде принуден да преминава през груба фрита и да барботира през стълб от течното вещество, обект на изследването.

Фигура 9



Фигура 10



▼ M1

Системата от сорбенти съдържа предна и спомагателна сорбентна част. При много ниски налягания на парите сорбентът задържа много малки количества и адсорбцията върху стъклената вата и стъклената тръба между пробата и сорбента може да се окаже сериозен проблем.

Охлажданите със сух лед (CO₂) уловители са друг ефикасен начин за натрупване на изпареното вещество. Те не пораждаат обратно налягане в колоната за насищане и също така е лесно отстраняването на уловеното вещество с определяне на количеството му.

1.5.7.3. *Методика*

Дебитът на изходящия газ носител се измерва при стайна температура. Дебитът се проверява често по време на опита, за да се гарантира, че общият обем на газа носител не е с точно определена стойност. Предпочита се непрекъснато следене с масов дебитомер. За насищането на газовата фаза може да е необходимо значително време на контакт и съответно доста ниски дебита на газа (25).

Накрая на опита предната и спомагателната част на сорбента се анализират поотделно. Съединението се десорбира от всяка от частите чрез добавяне на разтворител. Получените разтвори се подлагат на количествен анализ, за да се определи теглото, десорбирано от всяка от частите. Изборът на метода за анализ (както и изборът на сорбента и разтворителя за десорбцията) се определя от природата на изследваното вещество. Ефективността на десорбцията се определя, като се инжектира *предварително известно* количество от пробата върху сорбента, десорбира се и се анализира полученото количество. Важно е ефективността на десорбцията да се проверява при или близо до концентрацията на пробата при условията на опита.

За да се гарантира че газът носител е наситен с изследваното вещество, се използват три различни дебита на газа. Ако изчисленото налягане на парите не показва зависимост от дебита, се приема, че газът е наситен.

Налягането на парите се изчислява по формулата:

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

където:

p = налягане на парите (Pa)

W = масата на изпареното вещество, обект на изследването (g)

V = обема на наситения газ (m³)

R = универсалната газова константа, 8,314 (J mol⁻¹ K⁻¹)

T = температурата (K)

M = моларната маса на изследваното вещество (g mol⁻¹)

Измерените обеми трябва да се коригират според разликите в температурата и налягането между дебитомера и колоната за насищане.

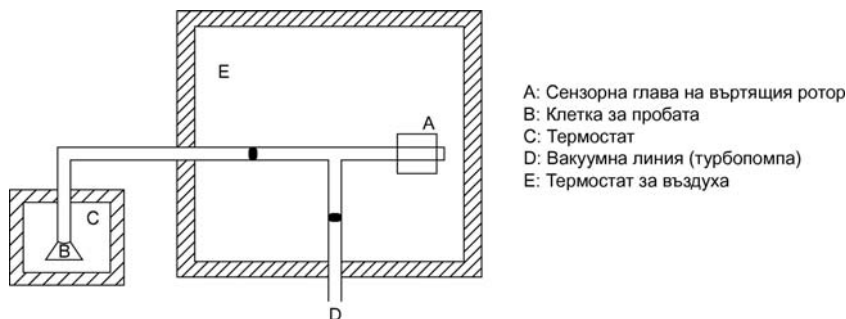
▼ **M1**1.5.8. **Въртящ се ротор**1.5.8.1. *Принцип*

Този метод използва измервателен уред за вискозитет с въртящ се ротор, в който измервателният елемент е малко стоманено топче, което е окачено в магнитно поле и се привежда във въртливо движение чрез въртящо поле (26)(27)(28). Наличието на измервателни намотки позволява да се измерва скоростта му на въртене. Когато топчето достигне дадена скорост на въртене (обикновено около 400 оборота в секунда), задвижването му се прекратява и скоростта му започва да намалява поради триенето с газовете. Намаляването на скоростта на въртене се измерва като функция на времето. Налягането на парите се получава от забавянето на стоманеното топче, което зависи от налягането. Препоръчителният обхват е от 10^{-4} до 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Апаратура*

На фигура 11 е показан схематичен чертеж на опитната постановка. Измервателната глава е поставена в термостатиран съд с регулиране на температурата с точност до 0,1 °C. Контейнерът с пробата е поставен в отделен съд, също с регулиране на температурата с точност до 0,1 °C. Всички останали части на постановката се поддържат на по-висока температура, за да се предотврати кондензиране. Целият апарат е свързан към система с висок вакуум.

Фигура 11

2. **РЕЗУЛТАТИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**2.1. **РЕЗУЛТАТИ**

При всеки от описаните методи налягането на парите трябва да се определи поне за две температури. За да се провери линейността на кривата на налягането на парите, е за предпочитане да се направят три или повече измервания в интервала $0 \div 50$ °C. В случая на ефузионния метод (кнудсенова клетка и изотермична термогравиметрия) и на метода с насищане на газ вместо $0 \div 50$ °C се препоръчва температурен интервал на измерване $120 \div 150$ °C.

2.2. **ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Протоколът от изпитването трябва да съдържа следната информация:

— използван метод,

▼ M1

- точна спецификация на веществото (вид и примеси) и предварителни етапи на пречистване, ако има такива,
- най-малко две стойности на налягането на парите и температурата, а за предпочитане три или повече стойности, в интервала $0 \div 50$ °C (или $120 \div 150$ °C),
- ако за избрания метод е технически възможно, поне една от температурите следва да бъде по-малка или равна на 25 °C,
- всички изходни данни,
- кривата на зависимостта на $\log p$ от $1/T$,
- оценка за налягането на парите при 20 или 25 °C.

Ако се наблюдава преход (промяна на агрегатното състояние, разграждане), трябва да се отбележи следната информация:

- естество на промяната,
- температура, при която се извършва промяната при атмосферното налягане,
- налягане на парите при 10 и 20 °C под температурата на прехода и 10 и 20 °C над тази температура (освен ако преходът не е от твърдо към газообразно състояние).

Цялата информация и забележките, свързани с интерпретацията на резултатите, трябва да се включат в протокола, особено когато става дума за примеси или за агрегатното състояние на веществото.

3. **ЛИТЕРАТУРА**

- (1) *Официален вестник на Европейските общности* L 383 A, 26—47 (1992 г.).
- (2) Ambrose, D. (1975). *Experimental Thermodynamics*, Vol. II, Le Neindre, B., and Vodar, B., Eds., Butterworths, London.
- (3) Weissberger R., ed. (1959). *Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry*, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.
- (4) Glasstone, S. (1946). *Textbook of Physical Chemistry*, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.
- (5) NF T 20—048 AFNOR (September 1985). *Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^5 Pa — Static method.*
- (6) ASTM D 2879—86, *Standard test method for vapour pressure — temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.*
- (7) NF T 20—047 AFNOR (September 1985). *Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa — Vapour pressure balance method.*

▼ M1

- (8) Knudsen, M. (1909). *Ann. Phys. Lpz.*, 29, 1979; (1911), 34, 593.
- (9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). *J. Chem. Thermodynamics* 7, 1173.
- (10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; *Pest Management Science* 56, 521—532.
- (11) Tomlin, C.D.S. (ed.), *The Pesticide Manual*, Twelfth Edition (2000)
- (12) Friedrich, K., Stambach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. *J. Chromatog.* 16 (1964), 22—28
- (13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., *Pesticide Science* 16 (1982), 269—278.
- (14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, *Thermochimia Acta* 112 Issue 1 (1987), 117—122.
- (15) Gückel, W., Synnatschke, G., Rittig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; *Pesticide Science* 4 (1973) 137—147.
- (16) Gückel, W., Synnatschke, G., Rittig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; *Pesticide Science* 5 (1974) 393—400.
- (17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; *Pesticide Science* 13 (1982) 161—168.
- (18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; *Pesticide Science* 45 (1995) 27—31.
- (19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); *Pesticide Science*, 53 (1998) 300—310.
- (20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; *Journal of Pharmaceutical Science* 87(12) (1998) 1512—20.
- (21) Lide, D.R. (ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range -25 °C to 150 °C.
- (22) Meister, R.T. (ed.), *Farm Chemicals Handbook*, Vol. 88 (2002)
- (23) 40 CFR, 796. (1993). pp 148—153, Office of the Federal Register, Washington DC

▼ M1

- (24) Rordorf B.F. (1985). *Thermochimica Acta* 85, 435.
- (25) Westcott et al. (1981). *Environ. Sci. Technol.* 15, 1375.
- (26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987). *J. Vac. Sci. Technol. (A)*, 5(4), 2440.
- (27) Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). *J. Vac. Sci. Technol.* 17(2), 642.
- (28) Fremerey, J.K. (1985). *J. Vac. Sci. Technol. (A)*, 3(3), 1715.

▼ M1

Допълнение

Метод за оценка

ВЪВЕДЕНИЕ

Стойностите по оценка на налягането на парите могат да се използват:

- за да се прецени кой от експерименталните методи е подходящ,
- за да се осигури приблизителна оценка или пределна стойност в случаите, в които експерименталният метод не може да бъде приложен по технически причини.

МЕТОД ЗА ОЦЕНКА

Налягането на парите на течности и твърди вещества може да се изчисли, като се използва преобразуваната зависимост на Уотсън (а). Опитно е необходимо да се определи само нормалната температура на кипене. Методът е приложим в целия обхват на наляганята от 10^5 до 10^{-5} Pa.

Подробна информация за метода е дадена в „Наръчника на методите за оценка на химичните свойства“ (б). Вижте също OECD Environmental Monograph No.67 (с).

МЕТОДИКА НА ИЗЧИСЛЯВАНЕ

Налягането на парите се изчислява, както следва:

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

където:

T = температурата, за която се прави изчислението

T_b = нормалната температура на кипене

P_{vp} = налягането на парите при температура T

ΔH_{vb} = топлината на изпарение

ΔZ_b = коефициентът на свиваемост (оценен на 0,97)

m = опитно определен коефициент, зависещ от агрегатното състояние при температурата, за която се прави изчислението

Освен това,

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

където K_F е опитно определен коефициент, отчитащ полярността на веществото. В препратка (б) са дадени коефициентите K_F за няколко типа съединения.

▼ M1

Доста често могат да се намерят данни, в които е дадена температурата на кипене при понижено налягане. В такъв случай налягането на парите се изчислява, както следва:

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

където T_1 е температурата на кипене при пониженото налягане P_1 .

ПРОТОКОЛ

Когато се използва метод за оценка, в протокола трябва да се включи пълна документация за изчисленията.

ЛИТЕРАТУРА

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



A.5. ПОВЪРХНОСТНО НАПРЕЖЕНИЕ

1. МЕТОД

Описаните методи се основават на Ръководството на ОИСР за провеждане на изпитвания (1). Основните принципи са дадени в препратка (2).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Описаните методи се прилагат за изпитване на повърхностното напрежение на водни разтвори.

Преди да се извършат тези изпитвания, е полезно да има предварителна информация за разтворимостта във вода, структурата, хидролизните свойства и критичната концентрация на мицелообразуване на веществото.

Описаните по-долу методи са приложими за повечето химични съединения без каквито и да било ограничения, свързани с тяхната степен на чистота.

Измерването на повърхностното напрежение с тензиометър с пръстен е ограничено до водни разтвори с динамичен вискозитет по-нисък от 200 mPa s.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Енталпията на единица площ от свободната повърхност се нарича повърхностно напрежение.

Повърхностното напрежение се измерва в:

N/m (SI-единица) или

mN/m (SI-подединица)

1 N/m = 10³ DYN/cm

1 mN/m = 1 DYN/cm в излязлата от употреба система CGS.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Не е необходимо да се използват вещества за сравнение във всички случаи, при които се изпитва ново вещество. Те трябва преди всичко да служат за периодична проверка на действието на метода, както и да позволяват сравнение с резултатите, получени по други методи.

В препратки (1) и (3) са дадени сравнителни вещества, които покриват широк обхват от повърхностни напрежения.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДИТЕ

Методите се основават на измерването на максималната сила, която трябва да се приложи вертикално върху скоба или пръстен, намиращи се в контакт с повърхността на изпитваната течност, поставена в измервателен съд, за да се отдели от повърхността ѝ, или върху пластинка, единият край на която се допира до повърхността, за да се прекъсне образуваният филм.

Веществата, които се разтварят във вода до концентрация най-малко 1 mg/l, се изпитват във воден разтвор само при една концентрация.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Методите могат да осигурят по-висока точност от тази, която вероятно се изисква при полеви измервания.

▼B

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДИТЕ

Приготвя се разтвор на веществото в дестилирана вода. Концентрацията на този разтвор трябва да бъде 90 % от концентрацията на наситения разтвор на веществото във вода; когато разтворимостта на веществото надвишава 1 g/l, при изпитванията се използва разтвор с концентрация 1 g/l. Не е необходимо да се извършват изпитвания върху вещества, чиято разтворимост във вода е по-ниска от 1 mg/l.

1.6.1. **Метод с използване на пластинка**

Виж ISO 304 и NF T 73-060 (Повърхностноактивни вещества — определяне на повърхностното напрежение чрез изтегляне на течни филми).

1.6.2. **Метод с използване на скоба**

Виж ISO 304 и NF T 73-060 (Повърхностноактивни вещества — определяне на повърхностното напрежение чрез изтегляне на течни филми).

1.6.3. **Метод с използване на пръстен**

Виж ISO 304 и NF T 73-060 (Повърхностноактивни вещества — определяне на повърхностното напрежение чрез изтегляне на течни филми).

1.6.4. **Метод на ОИСП с хармонизиран пръстен**1.6.4.1. *Апаратура*

За това изпитване могат да се използват тензиометри. Те се състоят от следните елементи:

- подвижна масичка за пробата,
- система за измерване на силата,
- измервателно тяло (пръстен),
- измервателен съд.

1.6.4.1.1. Подвижна масичка за пробата

Подвижната масичка е предназначена да поддържа измервателния съд с контролируема температура, в който е поставена течността за изпитване. Тя е монтирана на стенд заедно със системата за измерване на силата.

1.6.4.1.2. Система за измерване на силата

Системата за измерване на силата (виж фигурата) е разположена над масичката за пробата. Грешката при измерването на силата не бива да надвишава $\pm 10^{-6}$ N, което съответства на грешка в границите на $\pm 0,1$ mg при измерване на масата. В повечето случаи измервателната скала на разпространените в търговската мрежа тензиометри е калибрирана в mN/m, така че повърхностното напрежение може да се отчита направо в mN/m с точност 0,1 mN/m.

▼В

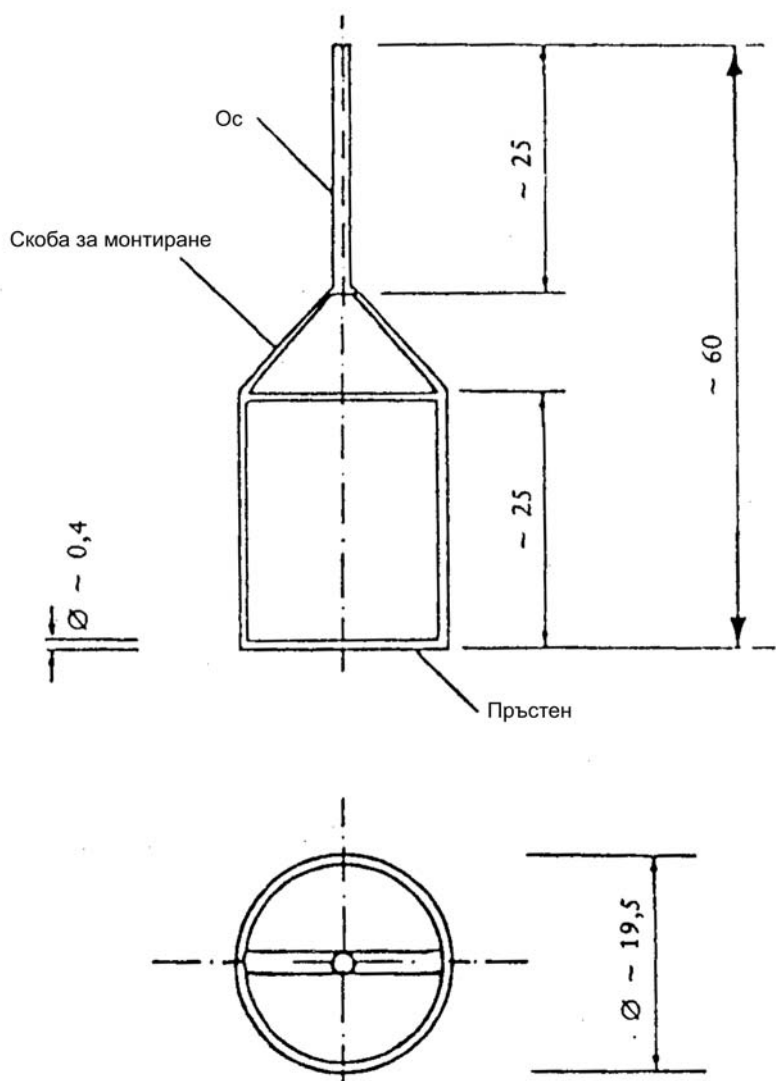
1.6.4.1.3. Измервателно тяло (пръстен)

Пръстенът обикновено се прави от платиново-иридиева жица с дебелина около 0,4 mm и обиколка 60 mm. Пръстенът се провесва в хоризонтално положение от метална ос и монтираща скоба, направена от жица, така че да се осигури връзката с измервателната система (вж. фигурата).

Фигура

Измервателно тяло

(всички размери са дадени в милиметри)



1.6.4.1.4. Измервателен съд

Измервателният съд, съдържащ разтвора за изпитване, е стъклен съд, чиято температура може да се контролира. Той трябва да е проектиран така, че по време на измерването температурата на изпитвания разтвор и на газовата фаза над него да остава постоянна, а пробата да не може да се изпарява. Допуска се използването на цилиндрични стъклени съдове с вътрешен диаметър не по-малък от 45 mm.

▼B1.6.4.2. *Подготовка на апаратурата*

1.6.4.2.1. Почистване

Стъклените съдове се почистват внимателно. Ако е необходимо, те се измиват с гореща бихромна смес, след това със сироповидна фосфорна киселина (от 83 до 98 тегл. % H_3PO_4), основно се изплакват с течаша вода и накрая се измиват с бидестилирана вода до неутрална реакция. След това се подсушават или се изплакват с част от течната проба, която подлежи на изпитване.

Пръстенът първо се изплаква основно с вода, за да се отстранят всички разтворими във вода вещества. После за кратко се потапя в бихромна смес, измива се с бидестилирана вода до неутрална реакция и накрая се загрява за малко над метанолов пламък.

Забележка:

Замърсяванията от вещества, които не се разтварят или разрушават от бихромната смес и от фосфорната киселина, като силиконовите материали, трябва да се отстранят с помощта на подходящ органичен разтворител.

1.6.4.2.2. Калибриране на апаратурата

Подготовката на апаратурата се състои в проверка на нулевата точка и настройване на показанията на инструмента, което да позволи провеждането на достоверни измервания в mN/m .

Инсталиране

Апаратурата трябва да се нивелира с помощта, например, на спиртен нивелир върху основата на тензиометъра, като се регулират нивелиращите винтове на основата.

Нагласяване на нулата

След монтирането на пръстена върху апаратурата и преди потапянето му в течността показанието на тензиометъра трябва да се нулира и да се провери дали пръстенът е разположен успоредно на повърхността на течността. За тази цел течната повърхност може да се използва като огледало.

Калибрационни процедури

Действителното пробно калибриране може да се извърши с помощта на една от следните две процедури:

- a) Чрез масата: при процедурата се използват тежести с определено тегло (между 0,1 и 1,0 g), разположени върху пръстена. Калибрационният коефициент Φ_a , с който се умножават всички показания на инструмента, се определя по следното уравнение (1):

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \quad (1)$$

където:

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

m = масата на допълнителната тежест (g)

g = земното ускорение (981 cm s^{-2} при морското равнище)

b = средната обиколка на пръстена (cm)

σ_a = показанието на тензиометъра след поставянето на тежестта върху пръстена (mN/m).

▼ B

- б) Чрез вода: използва се чиста вода, чието повърхностно напрежение например при 23 °C е равно на 72,3 mN/m. Тази процедура се изпълнява по-бързо, отколкото калибрирането с тежести, но винаги съществува опасност повърхностното напрежение на водата да не е истинското поради наличието на следи от повърхностноактивни вещества като замърсители.

Калибрационният коефициент Φ_b , по който трябва да се умножават всички показания на инструмента, се определя по следното уравнение (2):

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \quad (2)$$

където:

σ_o = стойността на повърхностното напрежение на водата, дадена в препратката (mN/m)

σ_g = измерената стойност на повърхностното напрежение на водата (mN/m) като и двете се взимат при една и съща температура.

1.6.4.3. *Подготовка на пробите*

Приготвят се водни разтвори с необходимите концентрации от изпитваните вещества, които не съдържат неразтворени вещества.

Разтворът трябва да се поддържа при постоянна температура ($\pm 0,5^\circ\text{C}$). Тъй като повърхностното напрежение на разтвора в измервателния съд се променя с течение на времето, трябва да се направят няколко измервания през различни интервали от време и да се начертае крива, показваща зависимостта на повърхностното напрежение от времето. Когато не се наблюдават повече изменения, се счита, че е достигнато равновесното състояние.

Прахът и газообразните замърсявания от други вещества пречат на измерването. Затова трябва да се работи под защитен похлупак.

1.6.5. **Условия на изпитването**

Изпитването се извършва при 20 °C, като температурата се контролира с точност от $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

1.6.6. **Провеждане на изпитването**

Изпитваният разтвор се прехвърля в добре почистен измервателен съд, като се внимава да не се образува пяна. След това съдът се поставя върху масичката на измервателната апаратура. Горният край на масичката заедно с измервателния съд се повдига, докато пръстенът се потопи под повърхността на разтвора. После горният край на масичката се сваля постепенно и равномерно (със скорост приблизително 0,5 cm/min), така че пръстенът да се отдели от повърхността. Това продължава до достигане на максималната стойност на силата. Течният слой, прикрепен към пръстена, не бива да се отдели от него. След приключване на изпитването пръстенът отново се потапя под повърхността и измерването се повтаря, докато се достигне постоянна стойност на повърхностното напрежение. При всяко определяне трябва да се записва времето от момента на прехвърлянето на разтвора в измервателния съд. Отчита се максималната сила, необходима за отделянето на пръстена от повърхността на течността.

▼B

2. ДАННИ

За да се изчисли повърхностното напрежение, отчетеното показание на апаратурата в mN/m първо се умножава по калибрационния коефициент Φ_a или Φ_b в зависимост от използваната процедура на калибриране. Така се получава стойност, която е само приблизителна и се нуждае от корекции.

Харкинс и Джордан (4) са определили емпирично корекционните коефициенти за измерените стойности на повърхностното напрежение по метода на пръстена. Тези стойности зависят от размерите на пръстена, плътността на течността и нейното повърхностно напрежение.

Тъй като определянето на корекционния коефициент по таблиците на Харкинс и Джордан за всяко отделно измерване е много трудоемък процес, при изчисляването на повърхностното напрежение на водни разтвори може да се използва улеснена процедура, която отчита от таблица направо коригираната стойност на повърхностното напрежение. (Когато отчетените при опита стойности се намират между посочените в таблицата, се прилага интерполация).

Таблица

Коригиране на измереното повърхностно напрежение

Само за водни разтвори, $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$

R	= 9,55 mm (среден радиус на пръстена)
r	= 0,185 mm (радиус на проводника, от който е направен пръстенът)

Отчетена стойност в резултат от изпитването (mN/m)	Коригирана стойност (mN/m)	
	Калибриране с тежести (вж. 1.6.4.2.2, буква а)	Калибриране с вода (вж. 1.6.4.2, буква б)
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9



Отчетена стойност в резултат от изпитването (mN/m)	Коригирана стойност (mN/m)	
	Калибриране с тежести (вж. 1.6.4.2.2, буква а)	Калибриране с вода (вж. 1.6.4.2, буква б)
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Тази таблица е съставена въз основа на данни от корекциите на Харкинс и Джордан. Тя е подобна на таблицата в стандарта DIN 53914 за вода и водни разтвори (плътност $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$ и се отнася за пръстен с размери $R = 9,55 \text{ mm}$ (среден радиус на пръстена) и $r = 0,185 \text{ mm}$ (радиус на проводника на пръстена). Таблицата предоставя коригираните стойности на повърхностното напрежение за изпитвания, проведени след калибриране с тежести или след калибриране с вода.

Без предварително калибриране повърхностното напрежение може да се изчисли по следната формула:

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

където:

F = силата, измерена с динамометър, в точката на прекъсване на филма

R = радиуса на пръстена

f = корекционния коефициент (1).

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

3.1. ПРОТОКОЛ С РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

По възможност протоколът с резултатите от изпитването трябва да включва следната информация:

— използван метод,

— тип на използвания разтвор,

— точно определение на веществото (вид и примеси),

— резултати от изпитванията: повърхностно напрежение (отчетено) — включват се показанията при отделните измервания и тяхната средноаритметична стойност, както и коригираната средна стойност (в която са взети под внимание типът на оборудването и корекционната таблица),

▼B

- концентрация на разтвора,
- температура на изпитването,
- време на престояване на разтвора; по-точно времето между приготвянето и измерването на разтвора,
- описание на зависимостта на повърхностното напрежение от времето след прехвърлянето на разтвора в измервателния съд,
- трябва да се докладват цялата информация и бележките върху интерпретацията на резултатите, особено онези, които са свързани с примесите и физичното състояние на веществата.

3.2. АНАЛИЗИРАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Като се има предвид, че повърхностното напрежение на водата е 72,75 mN/m при 20 °C, веществата с повърхностно напрежение, по-ниско от 60 mN/m, определено при условията на този метод, трябва да се разглеждат като повърхностноактивни вещества.

4. ПРЕПРАТКИ

- (1) ОИСП, Paris, 1981, Test Guideline 115, решение на Съвета C(81) 30 окончателен.
- (2) R. Weissberger ed.; *Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry*, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV.
- (3) *Pure Appl. Chem.*, 1976, vol. 48, 511.
- (4) Harkins, W. D., Jordan, H. F., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1930, vol. 52, 1751.

▼ M4**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“⁽¹⁾.

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 стъкленката, 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 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 поэтапна 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,

▼ **M4**

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 разтворими	за 0,1 g	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*

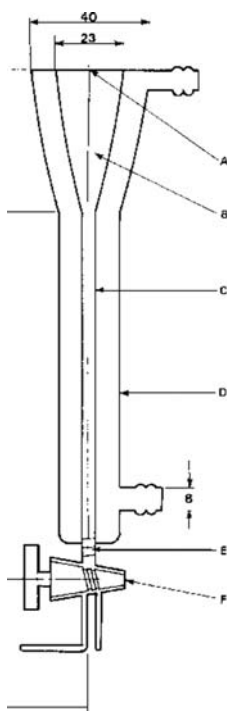
- Настоящият метод се основава на елуиране на изпитваното вещество с вода от микроколона, запълнена с инертен носител, предварително покрит с излишък от изпитваното вещество (2). Разтворимостта във вода се определя като масовата концентрация на елуата когато кривата на същата е достигнала плато като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

Апаратура

- Апаратът се състои от микроколона (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.
- 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.
- 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.

▼ M4

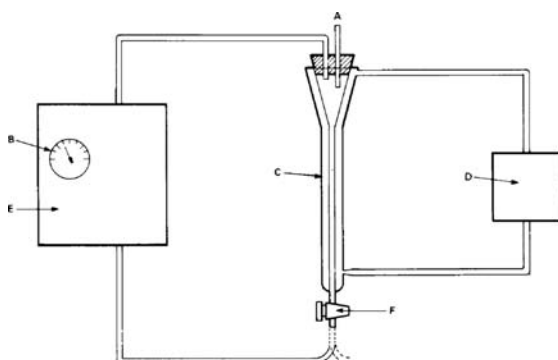
Фигура 1



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

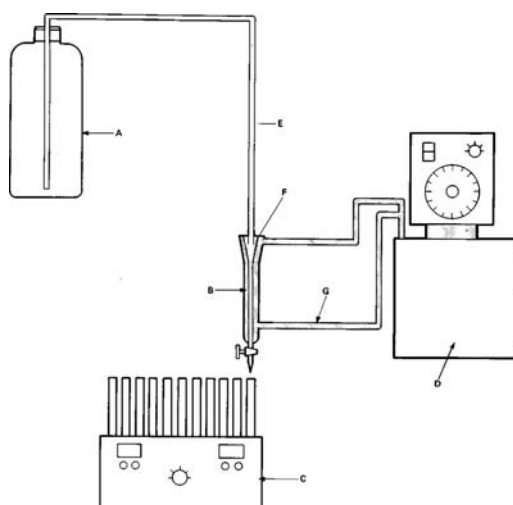
Фигура 2



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

▼ M4

Фигура 3



- A. Нивелиращ съд (например колба с обем 2,5 литра)
 B. Колоната
 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 облодънна 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. Натовареният 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, сухият носител, натоварен с веществото, може да се насипе в напълнената с вода микроколоната, 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 колоната 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.

▼ **M4***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. рН 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 желания 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 °С. 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 уравнивяване на един от съдовете в продължение на 24 часа при температурата на изпитването, като същият периодично се разклаща. След това съдържанието на съда се центрофугира при температурата на изпитването и концентрацията на изпитваното вещество в бистрата водна фаза се определя с подходящ

▼ **M4**

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. рН на всяка проба трябва да се измери, за предпочитане чрез използване на специални индикаторни ленти.

Аналитични определяния

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, волтамперометрия.

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 рН 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.

▼ M4*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



A.8. КОЕФИЦИЕНТ НА РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ

1. МЕТОД

Методът на „разклащането в стъкленница“ се основава на Ръководството за провеждане на изпитвания на ОИСП (1).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

За провеждането на това изпитване е полезно да има предварителна информация за структурната формула, дисоциационната константа, разтворимостта във вода, хидролизата, разтворимостта в n-октанол и повърхностното напрежение на веществото.

Изпитванията върху вещества, които могат да се йонизират, трябва да се провеждат в нейонната им форма (свободна киселина или свободна база). Тя се получава с помощта на подходящ буфер с рН, най-малко една единица по-ниско (свободна киселина) или по-високо (свободна база) от рК на веществото.

Този изпитвателен метод обхваща две отделни процедури: метод на разклащането в стъкленница и високочувствителна течна хроматография (HPLC). Първият метод се прилага, когато стойността на $\log P_{ow}$ (вижте по-долу при определенията) попада в областта от — 2 до 4, а вторият — в областта от 0 до 6. Преди да се проведе някоя от двете експериментални процедури, трябва да се направи предварителна оценка на коефициента на разпределение.

Методът на разклащането в стъкленница се прилага само за абсолютно чисти вещества, разтворими във вода и n-октанол. Той не може да се използва за повърхностноактивни вещества (за които трябва да се предостави изчислена стойност или приблизителна оценка, основана на разтворимостите им в n-октанол и във вода, получени поотделно).

Методът на HPLC не може да се прилага за силни киселини и основи, метални комплекси, повърхностноактивни материали или вещества, които реагират с елуиращия агент. За такива вещества трябва да се предостави изчислена стойност или приблизителна оценка, основана на разтворимостите им в n-октанол и във вода, получени поотделно.

Методът на HPLC е по-малко чувствителен към присъствието на примеси в изпитваното вещество, отколкото методът на разклащането в стъкленница. Независимо от това и при този метод в някои случаи присъствието на примеси може да доведе до трудно интерпретиране на резултатите, защото определянето на пиковите става несигурно. За смеси, които дават недобро разделяне на пиковите, трябва да се посочват горната и долната граница на $\log P$.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Коефициентът на разпределение (P) се дефинира като съотношението между равновесните концентрации (c_i) на разтвореното вещество в двуфазна система, която се състои от два практически несмесващи се разтворителя, в случая n-октанол и вода:

$$P_{ow} = \frac{c_n - \text{октанол}}{c_{\text{вода}}}$$

Следователно коефициентът на разпределение (P) представлява съотношение между две концентрации и обикновено се дава във формата на логаритъм при основа 10 ($\log P$).

▼B

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Метод на разклащането в стъкленца

Когато се изпитва ново вещество, не във всички случаи е необходимо да се използват вещества за сравнение. Преди всичко те трябва да служат за периодична проверка на действието на метода и да позволяват сравнение с резултатите, получени по други методи.

HPLC метод

За да се установи съотношението, в което се намират данните за дадено вещество, получени по метода на HPLC, и неговата R стойност, трябва да се начертае калибрационна графика на $\log R$ спрямо хроматографските данни. За целта се използват най-малко 6 точки, получени от сравнителни вещества. Подборът на подходящи сравнителни вещества остава на грижата на потребителя. Когато е възможно, поне едно съединение за сравнение трябва да има R_{ow} , по-високо от това на изпитваното вещество, а друго съединение за сравнение да има R_{ow} , по-ниско от това на изпитваното вещество. За стойности на $\log R$ по-малки от 4 калибрирането трябва да се основава на данни, получени по метода на разклащането в стъкленца. За стойности на $\log R$ по-големи от 4 калибрирането трябва да се базира на утвърдени литературни данни, ако те се съгласуват с изчислените стойности. По-висока точност може да се постигне, ако се изберат сравнителни вещества, подобни по структура на изпитваното вещество.

В литературните източници (2) и (3) могат да се намерят обширни списъци със стойностите на $\log R_{ow}$ за много групи от химични вещества. Ако не могат да се открият данни за коефициентите на разпределение на вещества, които са подобни по структура на изпитваното, може да се направи по-общо калибриране, като се използват други съединения за сравнение.

В допълнение 2 е даден списък от вещества, които се препоръчват като сравнителни, а също и техните R_{ow} стойности.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

1.4.1. Метод на разклащането в стъкленца

За да се намери коефициентът на разпределение, трябва да се достигне равновесие между всички взаимодействащи компоненти на системата и да се определят концентрациите на разтвореното вещество в двете фази. Изучаването на литературата по този въпрос показва, че за решаването на проблема — тоест смесването на двете фази и последващото им разделяне с цел определяне на равновесната концентрация на изпитваното вещество — могат да се използват няколко различни техники.

1.4.2. Метод на HPLC

Изпитването с HPLC се провежда в аналитични колонки с търговски пълнител, състоящ се от дълги въгледородни вериги (например C_8 , C_{18}), химически свързани към силициев диоксид. Химичните вещества, инжектирани в такава колонка, се придвижват по дължината ѝ с различна скорост поради различната степен на разпределение между подвижната фаза и неподвижната въгледородна фаза. Смесите от химични вещества се елуират по реда на тяхната хидрофобност, като разтворимите във вода вещества се елуират първи, а разтворимите в мазнини вещества се елуират последни в съответствие с техните коефициенти на разпределение между въгледородната и водната фаза. Това позволява да се установи връзка между времето на задържане в такава колонка (с обърната фаза) и коефициента на разпределение n -октанол/вода. Коефициентът на разпределение се извежда от коефициента на пропускане „ k “, който се дава с израза:

▼B

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

където t_r = времето на задържане на изпитваното вещество в колоната, а t_0 = средното време, необходимо на една молекула от разтворителя да премине през колоната (мъртво време).

Не е необходимо да се прилагат количествени аналитични методи. Нужно е само да се определят времената на елуиране.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

1.5.1. Повторяемост

Метод на разклащането в стъкленица

За да се постигне точно определяне на коефициента на разпределение, трябва да се направят по две изпитвания при три различни експериментални условия, които могат да се задават, като се променя количеството на изпитваното вещество, както и съотношенията между обемите на разтворителите. Определените стойности за коефициента на разпределение, изразени в десетични логаритми, трябва да попадат в областта $\pm 0,3$ логаритмични единици.

Метод на HPLC

За да се увеличи достоверността на резултатите, трябва да се правят по две изпитвания. Стойностите на $\log P$, получени при отделните изпитвания, трябва да попадат в областта $\pm 0,1$ логаритмични единици.

1.5.2. Чувствителност

Метод на разклащането в стъкленица

Областта, в която може да се използва методът, се определя от ограниченията на аналитичната процедура. Тя трябва да позволява оценка на стойностите на $\log P_{ow}$ в областта от -2 до 4 (в някои случаи, като се подберат условията, тази област може да се разшири до $\log P_{ow} = 5$), като концентрациите на разтвореното вещество във всяка от двете фази не надвишават $0,01$ мола на литър.

Метод на HPLC

Методът на HPLC позволява коефициентите на разпределение да се определят в областта на $\log P_{ow}$ от 0 до 6 .

Обикновено коефициентът на разпределение на едно вещество може да се прецени с точност до ± 1 логаритмична единица от стойността, получена по метода с разклащане на стъкленица. Типичните корелации могат да се намерят в литературните източници (4) (5) (6) (7) (8). По-висока точност се постига, когато корелационните графики се базират на подобни по структура съединения (9).

▼B**1.5.3. Специфичност***Метод на разклащането в стъкленца*

Законът на Нернст за разпределението се отнася само за разреждени разтвори при постоянна температура, налягане и рН. Той се прилага само за чисти вещества, разпределени между два чисти разтворителя. Резултатите могат да се повлияят, ако се окаже, че в едната или и в двете фази има няколко различни разтворени вещества.

Дисоциацията или асоциацията на разтворените молекули води до отклонения от Закона на Нернст за разпределението. Тези отклонения се откриват по това, че коефициентът на разпределение започва да зависи от концентрацията на разтвора.

Този метод не може да се прилага, без да се нанасят корекции за вещества, които могат да преминават в йонно състояние, поради многобройните равновесия, които се установяват в системата. За такива вещества вместо вода могат да се използват буферни разтвори; рН на буфера трябва да се различава от pK_a на веществото с поне една рН единица и винаги трябва да се внимава дали това рН е приложимо за дадената среда.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**1.6.1. Предварителна оценка на коефициента на разпределение**

За предпочитане е коефициентът на разпределение да се намери чрез изчислителни методи (вж. допълнение 1) или когато е възможно, от съотношението на разтворимостите на изпитваното вещество в чистите разтворители (10).

1.6.2. Метод на разклащането в стъкленца**1.6.2.1. Подготовка**

n-октанол: определянето на коефициента на разпределение трябва да се извършва в реактив с висока аналитична степен на чистота.

Вода: трябва да се използва дестилирана или бидестилирана в стъклен или кварцов съд вода. Ако е оправдано, за вещества, които имат йонна форма, вместо вода се използват буферни разтвори.

Забележка:

Не бива да се използва вода, взета направо от йонообменник.

1.6.2.1.1. Предварително насищане на разтворителите

Преди определянето на коефициента на разпределение двете фази на системата от разтворители трябва взаимно да се наситят, като се разклащат при температурата на изпитването. За да се направи това, е добре в два големи лабораторни съда да се поставят съответно n-октанол с висока степен на чистота и вода, към всеки съд да се добави достатъчно количество от другия разтворител и съдовете да се разклащат в продължение на 24 часа на механична клатка. След това те се оставят да престоят достатъчно дълго, така че фазите да се разделят и да се постигне състоянието на насищане.

▼B

1.6.2.1.2. Подготовка за изпитването

Целият обем на двуфазната система трябва да запълни почти изцяло измервателния съд. Това ще помогне да се избегне загубата на материал чрез изпарение. Съотношението на обемите на разтворителите и количеството вещество, които ще се използват при изпитването, се определят от следните фактори:

- предварителната оценка на коефициента на разпределение (вж. по-горе),
- минималното количество от изпитваното вещество, необходимо за провеждането на аналитичната процедура, и
- ограничението за максималната концентрация във всяка от фазите, което е 0,01 мола на литър.

Извършват се три изпитвания. При първото се използва изчисленото обемно съотношение на *n*-октанола към водата; при второто това съотношение се разделя на две; при третото отношението се умножава по две (например 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Изпитвано вещество

Приготвя се сток-разтвор в *n*-октанола, наситен с вода. Концентрацията на този разтвор трябва да се определи с висока точност, преди той да се използва за определяне на коефициента на разпределение. Разтворът се съхранява при условия, осигуряващи стабилността му.

1.6.2.2. Условия на изпитването

Температурата на изпитването трябва да се поддържа постоянна (± 1 °C) и да бъде в интервала от 20 до 25 °C.

1.6.2.3. Процедура на изпитването

1.6.2.3.1. Установяване на равновесието на разпределение

За всяко изпитване при дадени условия трябва да се приготвят по два изпитвателни съда, съдържащи необходимото точно премерено количество от двата разтворителя, заедно с нужното количество сток-разтвор.

Фазите на *n*-октанола трябва да се премерят по обем. Измервателните съдове се поставят в подходяща клатачна машина или се разклащат на ръка. Ако се използва центрофужна епруветка, препоръчително е тя да се завърта бързо на 180° около напречната ѝ ос, така че задържаният въздух да преминава през двете фази. Опитът е показал, че 50 такива завъртания обикновено са достатъчни да се достигне равновесието на насищане. За по-голяма сигурност е добре да се направят 100 завъртания за пет минути.

1.6.2.3.2. Разделяне на фазите

Когато е необходимо, разделянето на фазите се постига, като сместа се центрофугира. Това се прави на лабораторна центрофуга, в която се поддържа стайна температура, или ако се използва центрофуга без температурен контрол, центрофужните епруветки трябва да се темперират при температурата на изпитването поне един час преди анализа.

▼B1.6.2.4. *Анализ*

За да се определи коефициентът на разпределение, е необходимо да се измери концентрацията на изпитваното вещество във всяка от фазите. Това може да се направи, като се вземе аликвотна част от отделните фази във всяка епруветка при всяко измерване и тя се анализира с помощта на избраната процедура. Трябва да се изчисли общото количество вещество в двете фази и да се сравни с първоначално въведеното количество.

Пробата от водната фаза трябва да се вземе така, че рискът от замърсяване със следи от *n*-октанол да е минимален. За целта може да се използва стъклена спринцовка с подвижна игла. Първоначално спринцовката се запълва частично с въздух. Въздухът внимателно се изпуска, докато иглата преминава през слоя от *n*-октанол. Със спринцовката се поема необходимият обем от водната фаза. След това тя бързо се изважда от разтвора и иглата се отстранява. Тогава съдържанието на спринцовката може да се използва като проба от водната фаза. Концентрацията в двете разделени фази се определя за предпочитане по метод, специфичен за веществото. Примери за подходящи аналитични методи са следните:

- фотометрични методи,
- газова хроматография,
- високочувствителна течна хроматография.

1.6.3. **Метод на HPLC**1.6.3.1. *Подготовка**Апаратура*

Необходим е течен хроматограф, снабден с помпа за равномерно подаване на течности и подходящо отчиташо устройство. Препоръчва се да се използва инжекционен клапан с инжекционни скоби. Присъствието на полярни групи в неподвижната фаза може значително да влоши действието на HPLC-колоната. Затова неподвижната фаза трябва да има минимален процент от полярни групи (11). Могат да се използват търговските пълнители от микрочастици за обърнати фази или готови напълнени колони. Между инжекционната система и аналитичната колона може да се постави предпазна колона.

Подвижна фаза

Като елуиращи разтворители (които се дегазират преди употреба) се използват метанол и вода със степени на чистота за колонна хроматография. Прилага се изократно елуиране. Съотношенията метанол/вода трябва да предвиждат минималното съдържание на вода да бъде 25 %. Обикновено сместа метанол-вода 3:1 (v/v) е подходяща за елуиране на съединения с $\log P = 6$ в рамките на един час при скорост на потока = 1 ml/min. За вещества с по-високи стойности на $\log P$ може да се наложи намаляване на времето за елуиране (също и на сравнителните вещества), като се намали полярността на подвижната фаза или дължината на колоната.

Веществата с много ниска разтворимост в *n*-октанол често дават необичайно ниски стойности на $\log P_{ow}$ по метода на HPLC; пиковите на тези вещества понякога се появяват с фронта на разтворителя. Това вероятно се дължи на факта, че процесът на разпределение е твърде бавен, за да се достигне равновесие за времето, което обикновено се предвижда за разделянето чрез HPLC. Възможно е, като се намали скоростта на потока и/или съотношението метанол/вода, да се достигне до получаването на достоверна величина.

▼B

Както изпитваните, така и сравнителните вещества трябва да са разтворими в подвижната фаза в концентрации, достатъчни да позволят изпитването им. Използването на добавки към сместа от метанол и вода се разрешава само в изключителни случаи, тъй като те променят свойствата на колоната. За получаването на хроматограми с добавки задължително се използва отделна колона от същия тип. Ако сместа метанол-вода не е подходяща, може да се използва смес от друг органичен разтворител и вода, например етанол-вода или ацетонитрил-вода.

Стойността на рН на елуирация агент е важна за съединенията, които могат да преминават в йонна форма. Тя трябва да бъде в работната рН-област на колоната, която обикновено е между 2 и 8. Препоръчва се използването на буфери. Трябва да се внимава да се избегне утаяването на соли и замърсяването на колоната, което може да се получи при някои смеси органичен разтворител/буферен разтвор. Измерванията с HPLC с неподвижна фаза на базата на силициев диоксид при рН над 8 не се препоръчват, тъй като употребата на алкална подвижна фаза може да доведе до бързо влошаване на качествата на колоната.

Разтворени вещества

Сравнителните вещества трябва да бъдат с възможно най-голяма степен на чистота. Ако е възможно, веществата, които ще се изпитват, и тези, които ще се използват за калибриране, се разтварят в подвижната фаза.

Условия на измерването

Температурата по време на измерването не бива да се променя с повече от ± 2 К.

1.6.3.2. Измерване*Изчисляване на мъртвото време t_0*

Мъртвото време t_0 може да определи, като се използва или хомоложна серия (например п-алкилметил кетони), или органични съединения, които не се задържат (например тиоуреа или формамид). С помощта на хомоложна серия, мъртвото време t_0 се изчислява, като поредица от най-малко седем члена на хомоложния ред се инжектира в колоната и се определят съответните времена на задържане. Времената на задържане $t_{r(n_c+1)}$ се нанасят на графика като функция на $t_{r(n_c)}$, а отрязъкът „a“ и наклонът „b“ се определят по регресионното уравнение:

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

където n_c = броя въглеродни атоми. Тогава мъртвото време се дава с:

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

▼B*Калибрационна графика*

Следващата стъпка е да се построят корелационни криви на $\log k$ към $\log p$ за подходящи сравнителни вещества. На практика серия от 5 до 10 сравнителни вещества, чийто $\log p$ е близо до очакваната област, се инжектират едновременно и времената им на задържане се определят за предпочитане на записващ интегратор, свързан към измерителната системата. Съответните логаритми от коефициента на пропускане, $\log k$, се изчисляват и нанасят като функция от $\log p$, определен по метода на разклащането в стъкленница. Калибрирането се прави през равномерни интервали поне веднъж дневно, така че да се отчитат възможните изменения в работата на колоната.

Определяне на коефициента на пропускане на изпитваното вещество

Изпитваното вещество се инжектира в колоната с колкото е възможно по-малко количество от подвижната фаза. Определя се времето на задържане (два пъти), което позволява да се изчисли коефициентът на пропускане „ k “. Коефициентът на разпределение на изпитваното вещество може да се получи от корелационната графика на сравнителните вещества. За много ниски или много високи коефициенти на разпределение се налага да се извърши екстраполация. В тези случаи трябва да се внимава за границите на достоверност на регресионната права.

2. ДАННИ*Метод на разклащането в стъкленница*

Надеждността на определените стойности на R може да се провери, като се сравнят средните стойности от двукратните определения и средната стойност, получена от целия опит.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Протоколът с резултатите трябва по възможност да включва следната информация:

- точното описание на веществото (вид и примеси),
- когато гореспоменатите методи не могат да се приложат (например при повърхностноактивни вещества), трябва да се представи стойност, изчислена посредством разтворимостите в n -октанол и във вода, намерени поотделно,
- цялата информация и бележките относно интерпретирането на резултатите, особено онези, свързани с примесите и физичното състояние на веществото.

За метода на разклащането в стъкленница:

- резултатите от предварителните изпитвания, ако има такива,
- температурата на изпитването,
- данните за аналитичната процедура, с която са определяни концентрациите,
- времето и скоростта на центрофугиране, ако е провеждано такова,

▼B

- намерените концентрации в двете фази при всяко измерване (това означава, че се представят общо 12 концентрации),
- теглото на изпитваното вещество, обемът на отделните фази във всеки от измервателните съдове и изчисленото общо количество изпитвано вещество, което присъства във фазите след достигането на равновесие,
- изчислените стойности на коефициента на разпределение (P) и тяхната средна стойност за отделните изпитвания, проведени при дадени условия, както и средната стойност за всички опити. Ако има предположение, че коефициентът на разпределение зависи от концентрацията, това също трябва да се отбележи в протокола,
- съобщава се стандартното отклонение на индивидуалните P стойности от средната стойност,
- средната стойност на P от всички изпитвания трябва да се изрази и като десетичен логаритъм,
- изчисленото теоретично P_{ow} , когато тази величина е била определена или когато измерената стойност е $> 10^4$,
- рН на използваната вода, както и това на водната фаза по време на изпитването,
- ако са използвани буфери, трябва да се даде обосновка защо вместо вода е използван буфер, неговият състав, концентрацията и рН, рН на водната фаза преди и след изпитването.

За метода на HPLC:

- резултатите от предварителните изпитвания, ако има такива,
- изпитваните и сравнителните вещества и тяхната степен на чистота,
- температурната област на изпитванията,
- рН, при което са правени изпитванията,
- детайлно описание на аналитичната и предпазната колона, подвижната фаза и средствата, с които са провеждани изпитванията,
- данните за времето на задържане и литературни стойности на $\log P$ на сравнителните вещества, използвани за калибриране,
- данните за направената регресионна права ($\log k$ към $\log P$),
- данните за средното време на задържане и за интерполираната $\log P$ стойност на изпитваното съединение,
- описанието на оборудването и условията на работа,
- профилите на елуирането,
- количествата на изпитваното и на сравнителните вещества, въведени в колоната,
- мъртвото време и как е измерено.

▼B

4.

ПРЕПРАТКИ

- (1) ОИСП, Paris, 1981, Test Guideline 107, решение на Съвета C(18) 30 окончателен.
- (2) C. Hansch and A. J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.
- (3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A. J. Leo, dir.) — Available from Pomona College Medical Chemistry Project, 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.
- (4) L. Renberg, G. Sundstroem and K. Sundh-Nygaard, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.
- (5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219.
- (6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.
- (7) W. E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.
- (8) J. E. Haky and A. M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675.
- (9) S. Fujisava and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.
- (10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumspraxis (edited by E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223-339.
- (11) R.F. Rekker and H. M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.
- (12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.
- (13) R. F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.
- (14) NF T 20-043 AFNOR, 1985. Chemical products for industrial use — Determination of partition coefficient — Flask shaking method.
- (15) C. V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1 459.
- (16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.
- (17) C. Hansch, A. Leo, S. H. Unger, K. H. Kim, D. Nikaitani and E. J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1 207.
- (18) W. B. Neely, D. R. Branson and G. E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1 113.
- (19) D. S. Brown and E. W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.
- (20) J. K. Seydel and K. J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Activaetvon Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1979.

▼B

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



Допълнение 1

МЕТОДИ ЗА ИЗЧИСЛЯВАНЕ/ПРИБЛИЗИТЕЛНА ОЦЕНКА

ВЪВЕДЕНИЕ

Общо въведение към изчислителните методи, както и различни данни и примери, са дадени в Ръководството с методи за определяне на химични свойства (а).

Изчислените стойности на P_{ow} могат да се използват:

- за да се определи кой от експерименталните методи е по-подходящ (методът на разклащането в стъкленца се прилага в областта: $\log P_{ow} = -2$ до 4, а методът на HPLC — в областта: $\log P_{ow} = 0$ до 6),
- за да се изберат подходящи условия на изпитването (например сравнителни вещества за HPLC-процедурите, съотношение n-октанол/вода за метода на разклащането в стъкленца),
- като вътрешнолабораторна проверка за възможни експериментални грешки,
- за да се осигури приблизителна оценка на P_{ow} в случаите, когато експерименталните методи не могат да се приложат по технически причини.

МЕТОДИ ЗА ОЦЕНКА

Предварителна преценка на коефициента на разпределение

Стойността на коефициента на разпределение може да се оцени приблизително, като се използват разтворимостите на изпитваното вещество в чистите разтворители. За тази цел се пресмята:

$$P_{\text{прибл}} = \frac{\text{насимен } C_{\text{n-октанол}}}{\text{насимена } c}$$

ИЗЧИСЛИТЕЛНИ МЕТОДИ

Принцип на изчислителните методи

Всички изчислителни методи се основават на формалното фрагментиране на молекулата на подходящи подструктури, за които са известни надеждни стойности на $\log P_{ow}$. След това $\log P_{ow}$ на цялата молекула се изчислява, като се сумират стойностите на съответните фрагменти и се прибавят корекционни членове, отчитащи вътрешномолекулните взаимодействия.

Списък с константите на фрагментите и корекционните членове може да се намери в литературните източници (б) (в) (г) (д), някои от които редовно се осъвременяват (б).

Критерии за качество

По принцип надеждността на изчислителния метод се намалява с усложняването на изпитваното съединение. В случаите на прости молекули с ниски молекулни тегла и една или две функционални групи могат да се очакват отклонения от 0,1 до 0,3 логаритмични единици в стойностите на $\log P_{ow}$, получени по различни методи на фрагментиране и измерената стойност на тази величина. Когато молекулите са по-сложни, грешката става по-голяма. Тя зависи от надеждността и достъпността на фрагментационните константи, както и от възможността да се разпознаят вътрешномолекулните взаимодействия (например водородни връзки). Тя зависи също и от правилното използване на корекционните членове (този проблем отпада, ако се използва компютърният софтуер CLOGP-3) (б). За съединения, които могат да преминават в йонно състояние, е важно да бъдат пресметнати правилно зарядът и степента на йонизацията.

▼ B**Изчислителни процедури***π-метод на Хани*

Първоначалната константа за хидрофобен заместител π , въведена от Фуджира и сътрудници (е), е дефинирана като:

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

където $P_{ow}(\text{PhX})$ е коефициентът на разпределение на ароматното производно, а $P_{ow}(\text{PhH})$ е този на основното съединение.

Например:

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

Съответно на названието си, π -методът се прилага предимно за ароматни съединения. Стойностите π на голям брой заместители са дадени в таблици в (б), (в) и (г). Те се използват за изчисляване на $\log P_{ow}$ за ароматни молекули или ароматни субструктури.

Метод на Рекер

Според Рекер (ж) стойността на $\log P_{ow}$ се изчислява така:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{корекционни шенове})$$

Където f_j представляват константите на различни молекулни фрагменти, а a_i — честотата, с която те се срещат в изпитваната молекула. Корекционните членове могат да се представят като интегрален множител на една обща константа C_m (така наречената „магическа константа“). Фрагментационните константи f_j и C_m се определят от списък от 1 054 експериментално получени стойности на P_{ow} (825 съединения), като се използва мултипликативен регресионен анализ (в) (з). Определянето на членовете, отчитащи вътрешномолекулните взаимодействия, става по редица от правила, описани в препратки (д) (з) (и).

Метод на Хани и Лео

Според Хани и Лео (в), стойността на $\log P_{ow}$ се изчислява по уравнението:

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

където f_i представляват константите на различни молекулни фрагменти, F_j – корекционните членове, а „a“ и „b“ са съответните честоти, с които се срещат тези фрагменти. Изведени от експерименталните стойности на P_{ow} по принципа на пробата и грешката, са получени списъци от стойностите на атомни и групови фрагменти, както и списъци с корекционните членове F_j (така наречените „фактори“). В (а) и (в) са предложени корекционните членове за няколко различни класа. Доста трудоемко и бавно е да се вземат под внимание всички правила и корекционни параметри. Затова са разработени софтуерни продукти (б).

Комбиниран метод

Изчисляването на $\log P_{ow}$ за сложни молекули може значително да се подобри, ако молекулата се раздели на по-големи структури, за които могат да се намерят точни $\log P_{ow}$ стойности или от таблици (б) (в), или от собствени измервания. Такива фрагменти (например хетероцикли, антрахинон, азобензен) могат да се комбинират с π -стойностите на Хани или с фрагментационните константи на Рекер и Лео.

Забележки:

- i) Изчислителните методи могат да се прилагат само за съединения, които преминават частично или напълно в йонно състояние, където е възможно да се предвидят необходимите корекционни фактори.

▼B

- ii) Ако може да се предположи наличието на вътрешномолекулни водородни връзки, трябва да се прибавят съответните корекционни членове (прибл. от + 0,6 до + 1,0 $\log P_{ow}$ единици) (а). Данни за присъствието на такива връзки могат да се получат от пространствени модели или от спектроскопски данни за молекулата.
- iii) Ако са възможни няколко тавтомерни форми, за основа на изчисленията се взема най-вероятната форма.
- iv) Внимателно трябва да се следят промените, които се правят в списъците от константи на фрагментите.

Отчитане на резултатите

Когато се използват методи за изчисляване или приблизителна оценка, в протокола трябва по възможност да се включи следната информация:

- описание на веществото (смес, примеси и т.н.),
- признаци за възможни вътрешномолекулни водородни връзки, за дисоциация, поява на заряд или някакви други необичайни ефекти (напр. тавтомерия),
- описание на изчислителния метод,
- указание какви бази данни са използвани или предоставяне на такива,
- особености при подбора на фрагментите,
- разбираема документация от изчисленията.

ПРЕПРАТКИ

- (а) W. J. Lyman, W. F. Rehl and D. H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.
- (б) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremon, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP - 3).
- (в) C. Hansch, A. J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.
- (г) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.
- (д) F. Rekker, H. M., de Kort, E. J. Med. Chem. - Chill. Ther., 1979, vol. 14, 479.
- (е) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Am. Chem. Soc., 1964, vol. 86, 5175.
- (ж) R. F. Rekker, The hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacology Library, Elsevier, New York, 1977, vol. 1.
- (з) C. V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.
- (и) R. A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington DC, 1984, Symposium Series 255, p. 225.



Допълнение 2

Препоръчвани сравнителни вещества за метода на HPLC

№	Сравнително вещество	log P _{ow}	pK _a
1	2-бутанон	0,3	
2	4-ацетилпиридин	0,5	
3	Анилин	0,9	
4	Ацетанилид	1,0	
5	Бензилов алкохол	1,1	
6	p-метоксифенол	1,3	pK _a = 10,26
7	Феноксиоцетна киселина	1,4	pK _a = 3,12
8	Фенол	1,5	pK _a = 9,92
9	2,4-динитрофенол	1,5	pK _a = 3,96
10	Бензонитрил	1,6	
11	Фенилацетонитрил	1,6	
12	4-метилбензилов алкохол	1,6	
13	Ацетофенон	1,7	
14	2-нитрофенол	1,8	pK _a = 7,17
15	3-нитробензоена киселина	1,8	pK _a = 3,47
16	4-хлороанилин	1,8	pK _a = 4,15
17	Нитробензен	1,9	
18	Канелен алкохол	1,9	
19	Бензоена киселина	1,9	pK _a = 4,19
20	p-крезол	1,9	pK _a = 10,17
21	Канелена киселина	2,1	pK _a = 3,89 цис 4,44 транс
22	Анизол	2,1	
23	Метилбензоат	2,1	
24	Бензен	2,1	
25	3-метилбензоена киселина	2,4	pK _a = 4,27
26	4-хлорфенол	2,4	pK _a = 9,1
27	Трихлоретилен	2,4	
28	Атрацин	2,6	
29	Етилбензоат	2,6	
30	2,6-дихлоробензонитрил	2,6	
31	3-хлорбензоена киселина	2,7	pK _a = 3,82
32	Толуен	2,7	
33	1-нафтол	2,7	pK _a = 9,34
34	2,3-дихлоранилин	2,8	
35	Хлорбензен	2,8	
36	Алил-фенил етер	2,9	
37	Бромбензен	3,0	

▼ B

№	Сравнително вещество	log P _{ow}	pK _a
38	Етилбензен	3,2	
39	Бензофенон	3,2	
40	4-фенилфенол	3,2	pK _a = 9,54
41	Тимол	3,3	
42	1,4-дихлорбензен	3,4	
43	Дифениламин	3,4	pK _a = 0,79
44	Нафтален	3,6	
45	Фенилбензоат	3,6	
46	Изопропилбензен	3,7	
47	2,4,6-трихлорфенол	3,7	pK _a = 6
48	Бифенил	4,0	
49	Бензилбензоат	4,0	
50	2,4-динитро-6-sec.-бутилфенол	4,1	
51	1,2,4-трихлорбензен	4,2	
52	Додеканова киселина	4,2	
53	Дифенилов етер	4,2	
54	n-бутилбензен	4,5	
55	Фенантрен	4,5	
56	Флуорантен	4,7	
57	Дибензил	4,8	
58	2,6-дифенилпиридин	4,9	
59	Трифениламин	5,7	
60	ДДТ	6,2	
Други сравнителни вещества с нисък log P _{ow}			
1	Никотинова киселина	-0,07	

▼B**A.9. ТОЧКА НА ВЪЗПЛАМЕНЯВАНЕ****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Преди да се проведе това изпитване, е полезно да има предварителна информация за запалимостта на веществото. Изпитвателната процедура се прилага за течни вещества, чиито пари могат да се възпламенят от източници на възпламеняване. Методите за изпитване, изброени в този текст, дават достоверни резултати само за онези обхвати от точки на възпламеняване, които са посочени в отделните методи.

При подбора на метода трябва да се предвиди възможността за химична реакция между веществото и държателя на пробата.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Точката на възпламеняване е най-ниската температура, коригирана към налягане 101,325 kPa, при която една течност, в условията на метода, отделя пари в такова количество, че в измервателния съд се получават запалими пари или смес, запалима на въздух.

Единици: °C

$$t = T - 273,15$$

(t в °C и T в K)

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Не във всички случаи, когато се изпитва ново вещество, е необходимо да се използват вещества за сравнение. Преди всичко те трябва да служат за периодична проверка на действието на метода и да позволяват сравняване с резултатите, получени по други методи.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Веществото се поставя в изпитвателен съд и се нагрява или охлажда до температурата на изпитване по начина, който е описан при отделните методи за изпитване. Правят се опити за запалване на веществото, за да се разбере дали пробата може да се възпламени при дадената температура.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО**1.5.1. Повторяемост**

Повторяемостта е различна в зависимост от областта, в която се намира точката на възпламеняване и от използвания метод за измерването ѝ; максимум 2°C.

1.5.2. Чувствителност

Чувствителността зависи от използвания метод на изпитване.

1.5.3. Специфичност

Специфичността на някои от методите е ограничена до няколко обхвата от точки на възпламеняване и е свързана с данните за самото вещество (например висок вискозитет).

▼B

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. Подготовка

Проба от изпитваното вещество се поставя в изпитвателния апарат съгласно 1.6.3.1 и/или 1.6.3.2.

С оглед на безопасността се препоръчва при този метод да се употребяват само проби с малък размер — до 2 cm³, от горива или токсични вещества.

1.6.2. Условия на изпитването

Доколкото е съобразно с оглед на безопасността, апаратът трябва да се постави на място, където не става течение.

1.6.3. Извършване на изпитването

1.6.3.1. Равновесен метод

Вж. ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. Неравновесен метод

Апарат на Абел:

Вж. BS 2000 част 170, NF M 07-011, NF T 66-009.

Апарат на Абел-Пенски:

Вж. EN 57, DIN 51755 част 1 (за температури от 5 до 65 °C), DIN 51755 част 2 (за температури под 5 °C), NF M 07-036.

Апарат на Таг:

Вж. ASTM D 56.

Апарат на Пенски-Мартенс:

Вж. ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M 07-019.

Забележки:

Когато точката на възпламеняване, определена по неравновесния метод от 1.6.3.2, се окаже 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C или 55 ± 2 °C, тя трябва да се потвърди със същия апарат по равновесния метод.

В протокола се посочват само методите, чрез които се определя температурата, при която е измерена точката на възпламеняване.

За да се определи точката на възпламеняване на вискозни течности (бои, лепила и други подобни), съдържащи разтворители, се използват само апарати и методи за изпитване, подходящи за определяне на точката на възпламеняване на вискозни течности.

Вж. ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 част 1.

▼B

2. **ДАНИИ**

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Протоколът с резултатите от изпитването трябва по възможност да включва следната информация:

- точно определение на веществата (вид и примеси),
- съобщава се използваният метод, както и всички възможни отклонения от него,
- резултатите и всички допълнителни бележки относно тяхното интерпретиране.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

Няма.

▼B**A.10. ЗАПАЛИМОСТ (ТВЪРДИ ВЕЩЕСТВА)****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Преди да се проведе това измерване, е полезно да има предварителна информация за потенциалните експлозивни свойства на веществото.

Методът трябва да се прилага само върху прахообразни, зърнести или пастообразни вещества.

За да не бъдат включвани всички вещества, които могат да се запалват, а само онези, които горят бързо или чието поведение при горене по някакъв начин е особено опасно, за леснозапалими се считат само веществата със скорост на изгаряне, по-висока от някаква гранична стойност.

Особено опасно е, ако накаляването до бяло се разпространи през разпрасен метал, защото гасенето на пожара е свързано с много трудности. Разпрасените метали се считат за леснозапалими, ако поддържат разпространението на накаляването през масата си в рамките на определено време.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Време на изгаряне, изразено в секунди.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма определени.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Веществото се формова в непрекъсната лента или ако е прахообразно, се насипва под формата на лента, дълга около 250 mm. Провежда се предварителен скрийнинг, за да се определи дали при запалване с газова горелка горенето се разпространява с пламък, или започва тлеене. Ако в рамките на определено време горенето се разпространи до над 200 mm от дължината на лентата, се провежда пълната програма за измерване на скоростта на изгаряне.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Не са определени.

▼B

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. **Предварителен скрийнинг-метод**

Веществото се формова в непрекъсната лента или се насипва под формата на купчинка с дължина 250 mm, ширина 20 mm и височина 10 mm върху плоча от негорящ непорьозен материал с ниска топлопроводимост. Горещият пламък на газовата горелка (с минимален диаметър 5 mm) се допира до единия край на лентата, докато пудрата се запали или най-много за 2 минути (5 минути за разпрасени метали или метални сплави). Трябва да се проследи дали горенето се разпространява до 200 mm от дължината на лентата в рамките на 4 минути (или 40 минути за разпрасени метали). Ако веществото не се запали или не разпространява горенето (чрез изгаряне с пламък или чрез тлеене) до 200 mm от лентата за по-малко от 4 минути (или 40 минути), веществото не се счита за високозапалимо и не е необходимо да се провеждат повече измервания. Ако веществото разпространява горенето на 200 mm дължина за по-малко от 4 минути (или 40 минути за разпрасени метали), трябва да се приложи описаната по-долу процедура (точка 1.6.2 и следващите).

1.6.2. **Измерване на скоростта на горене**1.6.2.1. *Подготовка*

Прахообразните или зърнести вещества се насипват свободно в матрица с дължина 250 mm и триъгълно напречно сечение с височина на вътрешната част 10 mm и ширина 20 mm. От двете страни на матрицата надлъжно се монтират две метални пластини като латерални ограничители. Те изпъкват с 2 mm над горния край на триъгълното сечение (фигура). След това матрицата се пуска три пъти от височина 2 cm върху твърда повърхност и при необходимост се допълва догоре. После латералните ограничители се махат и излишното вещество се изважда. Върху матрицата се поставя плоча от негорящ непорьозен материал с ниска топлопроводимост, приспособлението се обръща и матрицата се отстранява.

Пастообразните вещества се разстилат върху плочата от негорящ гладък материал с ниска топлопроводимост под формата на въже с дължина 250 mm и напречно сечение около 1 cm².

1.6.2.2. *Условия на изпитването*

Ако изпитваното вещество е чувствително към влага, изпитването трябва да се извърши колкото е възможно по-бързо след неговото изваждане от контейнера.

1.6.2.3. *Провеждане на изпитването*

Купчинка от веществото се поставя напречно на въздушния поток във вентилационен шкаф.

Скоростта на въздуха трябва да е достатъчно висока, за да се избегне излитането на парите в лабораторията, и не бива да се променя по време на изпитването. Около апарата се издига защитен екран.

Горещият пламък от газова горелка (с минимален диаметър 5 mm) се използва за запалването на купчината от единия край. Когато купчината изгори до дължина 80 mm, се измерва скоростта на изгаряне на следващите 100 mm.

▼B

Изпитването се провежда шест пъти (освен ако по-рано не се наблюдава положителен резултат), като всеки път се използва чиста студена плоча.

2. ДАННИ

За изчисленията се използват времето на изгаряне, получено от предварителния скрийнинг (1.6.1) и най-краткото време на изгаряне от най-много шест изпитвания (1.6.2.3).

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗМЕРВАНЕТО**

Протоколът с резултатите от изпитването трябва по възможност да съдържа следната информация:

- точно определение на веществото (вид и примеси),
- описание на изпитваното вещество, неговото физично състояние, включително съдържанието на влага,
- резултати от предварителния скрийнинг и от измерването на скоростта на изгаряне, ако е правено такова,
- всички допълнителни бележки относно интерпретирането на резултатите.

3.2. ИНТЕРПРЕТИРАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Прахообразните, зърнестите или пастообразните вещества трябва да се считат за леснозапалими, ако времето на изгаряне, получено при някое от изпитванията съгласно изпитвателната процедура, описана в 1.6.2, е по-малко от 45 секунди. Разпръшените метали или метални сплави се считат за леснозапалими, ако могат да се възпламенят и пламъкът или зоната на реакцията се разпространяват по цялата дължина на образеца за 10 минути или по-малко.

4. ПРЕПРАТКИ

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

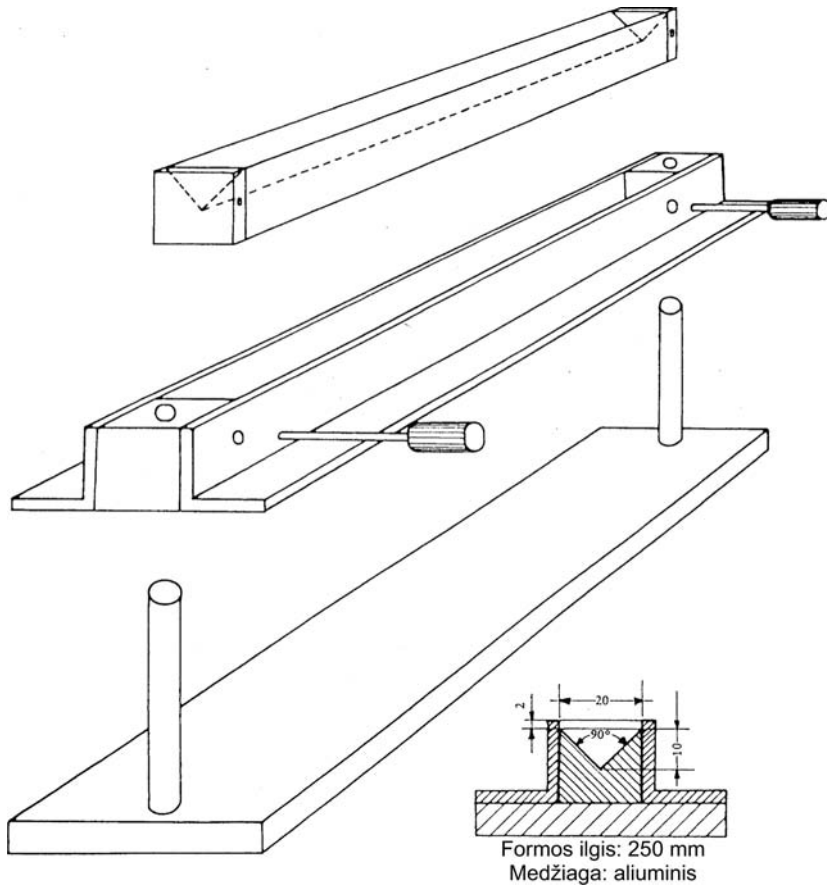
▼B

Допълнение

Фигура

Матрица и спомагателни приспособления за приготвяне на купчинката от
веществото

(всички размери са в милиметри)



▼B**A.11. ЗАПАЛИМОСТ (ГАЗОВЕ)****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Този метод позволява да се определи дали газовете, смесени с въздух при стайна температура (до 20 °C) и атмосферно налягане, са запалими и ако е така, в каква област от концентрация става запалването. Смесите с нарастващи концентрации на изпитвания газ във въздух се подлагат на действието на електрическа искра и се наблюдава дали следва запалване.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Областта на запалимост представлява областта от концентрации между горната и долната граница на експлозивност. Горната и долната граница на експлозивност са онези граници на концентрацията на запалимия газ при смесването му с въздуха, при които не се наблюдава разпространяване на пламък.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Не са определени.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Концентрацията на газа във въздух се увеличава постепенно, като на всяка стъпка сместа се подлага на действието на електрическа искра.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Не са дадени.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**1.6.1. Апаратура**

Измервателният съд представлява изправен стъклен цилиндър с минимален вътрешен диаметър 50 mm и минимална височина 300 mm. Запалителните електроди са разделени на разстояние от 3 до 5 mm и са разположени на височина 60 mm от дъното на цилиндъра. Цилиндърът е снабден с отвор за намаляване на налягането. Апаратът трябва да бъде защитен с екран, за да се ограничат щетите при експлозия.

Като средство за запалване се използва стояща индукционна искра с продължителност 0,5 sec, която се генерира от трансформатор за високо напрежение с изходно напрежение от 10 до 15 kV (максимална входна мощност 300 W). Пример за подходящ апарат е описан в препратка (2).

1.6.2. Условия на изпитването

Изпитването трябва да се провежда при стайна температура (около 20 °C).

▼B**1.6.3. Провеждане на изпитването**

Смес от газ и въздух с известна концентрация на газа се въвежда в стъкления цилиндър с помощта на пропорционарна помпа. През сместа се прекарва искра и се наблюдава дали пламъкът се отделя самостоятелно от източника на възпламеняване и дали се разпространява независимо. Концентрацията на газа се променя на стъпки от 1 об. %, докато протече запалването по описания по-горе начин.

Ако химичната структура на газа показва, че той може да не е запалим и ако стехиометричната му смес с въздуха може да се пресметне, е необходимо да се изпитват на стъпки от 1 % само смеси с концентрации на газа до 10 %, следователно стехиометричният състав е над 10 %.

2. ДАННИ

За определянето на това свойство единствената полезна информация е наличието на разпространение на пламъка.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Протоколът с резултатите от изпитването трябва по възможност да съдържа следната информация:

- точно определение на веществото (вид и примеси),
- описание и размери на използвания апарат,
- температурата, при която е проведено изпитването,
- измерени концентрации и получени резултати,
- резултат от изпитването: незапалим газ или леснозапалим газ,
- ако е направено заключението, че газът не е запалим, трябва да се съобщи обхватът от концентрации, в който е проведено изпитването на стъпки от 1 %,
- да се отчете цялата информация и всички бележки, свързани с интерпретирането на резултатите.

4. ПРЕПРАТКИ

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

▼B**A.12. ЗАПАЛИМОСТ (ПРИ КОНТАКТ С ВОДА)****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Този метод за изпитване може да се използва, за да се определи дали реакцията на дадено вещество с вода или влажен въздух води до появата на опасно количество от един или няколко газа, които може да се окажат леснозапалими.

Методът може да се прилага както за твърди, така и за течни вещества. Той не се прилага за вещества, които се запалват спонтанно при контакт с въздуха.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Леснозапалими: веществата, които при контакт с вода или влажен въздух отделят леснозапалими газове в опасни количества с минимална скорост 1 литър/kg за един час.

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Веществото се изпитва съгласно описаната по-долу последователност от стъпки; ако при някоя стъпка протече запалване, не са необходими повече изпитвания. Ако е известно, че веществото не реагира бурно с вода, се продължава до стъпка 4 (1.3.4).

1.3.1. Стъпка 1

Изпитваното вещество се поставя в плитък съд, съдържащ дестилирана вода, при 20 °C и се наблюдава дали отделеният газ се запалва или не.

1.3.2. Стъпка 2

Изпитваното вещество се поставя на филтърна хартия, която плува на повърхността на съд, напълнен с дестилирана вода, при 20 °C и се наблюдава дали отделеният газ се запалва. Филтърната хартия е необходима само да задържа веществото на едно място, така че да се увеличи вероятността от запалване.

1.3.3. Стъпка 3

Прави се купчинка от изпитваното вещество с височина приблизително 2 cm и диаметър 3 cm. В купчинката се капват няколко капки вода и се наблюдава дали отделеният газ се запалва.

1.3.4. Стъпка 4

Изпитваното вещество се смесва с дестилирана вода при 20 °C и скоростта на отделяне на газ се измерва в продължение на седем часа на едночасови интервали. Ако скоростта на отделяне на газа е променлива или нараства в края на седемчасовия период, времето на изпитване трябва да се удължи до максимум пет дена. Изпитването се прекратява в момента, в който скоростта на отделяне надвиши 1 литър/kg за час.

▼B

- 1.4. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ
Не са определени.
- 1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО
Не са дадени.
- 1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА
- 1.6.1. **Стъпка 1**
- 1.6.1.1. *Условия на изпитването*
Изпитването се провежда при стайна температура (около 20 °C).
- 1.6.1.2. *Провеждане на изпитването*
Малко количество (приблизително 2 mm в диаметър) от изпитваното вещество се поставя в плитък съд с дестилирана вода. Следи се: i) дали се отделя газ, и ii) дали газът се запалва. Ако се наблюдава запалване на газа, не са необходими повече изпитвания на веществото, защото то се определя като опасно.
- 1.6.2. **Стъпка 2**
- 1.6.2.1. *Приспособление за изпитване*
Филтърна хартия се поставя да легне на повърхността на дестилирана вода в подходящ съд, например изпарителен съд с диаметър 100 mm.
- 1.6.2.2. *Условия на изпитването*
Изпитването се провежда при стайна температура (около 20 °C).
- 1.6.2.3. *Провеждане на изпитването*
Малко количество от изпитваното вещество (приблизително 2 mm в диаметър) се поставя в центъра на филтърната хартия. Следи се: i) дали се отделя газ, и ii) дали газът се запалва. Ако се наблюдава запалване на газа, не са необходими повече изпитвания на веществото, защото то се определя като опасно.
- 1.6.3. **Стъпка 3**
- 1.6.3.1. *Условия на изпитването*
Изпитването се провежда при стайна температура (около 20 °C).
- 1.6.3.2. *Провеждане на изпитването*
Оформя се купчинка от изпитваното вещество с височина приблизително 2 cm и диаметър 3 cm, на върха на която се прави вдлъбнатина. Във вдлъбнатината се прибавят няколко капки вода и се следи: i) дали се отделя газ, и ii) дали газът се запалва. Ако се наблюдава запалване на газа, не са необходими повече изпитвания на веществото, защото то се определя като опасно.

▼B1.6.4. **Стъпка 4**1.6.4.1. *Апаратура*

Апаратурата се приготвя, както е показано на фигурата.

1.6.4.2. *Условия на изпитването*

Проверява се дали контейнерът с веществото съдържа прахообразни частици с размери $< 500 \mu\text{m}$. Ако прахът е повече от 1 тегл. % от общото количество или веществото е ронливо, цялото вещество трябва да се стрие на прах преди изпитването, така че при съхранение или работа с него да няма възможност за намаляване на размера на частиците. В противен случай веществото се изпитва така, както е получено. Изпитването се провежда при стайна температура (около $20 \text{ }^\circ\text{C}$) и атмосферно налягане.

1.6.4.3. *Провеждане на изпитването*

От 10 до 20 ml вода се поставят в делителната фуния на апарата. Десет грама от веществото се слагат в коничната колба. Обемът на отделения газ може да се измерва с някое подходящо приспособление. Запушалката на делителната фуния се маха, за да може водата да влиза в коничната колба, и часовникът се пуска. Отделеният газ се измерва на всеки час в продължение на седем часа. Ако по време на този период отделянето на газ е неравномерно или ако в края на периода скоростта на отделяне нараства, изпитването трябва да продължи до максимум пет дена. Ако в даден момент от изпитването скоростта на отделяне на газа надвиши 1 литър/kg за час, изпитването се прекратява. Изпитването се провежда три пъти.

Ако химичната природа на газа не е известна, той трябва да се анализира. Когато газът съдържа леснозапалими компоненти и не е известно дали цялата смес не е леснозапалима, трябва да се приготви смес със същия състав и да се изпита по метод А.11.

2. **ДАНИИ**

Веществото се счита за опасно, ако:

— при някоя от стъпките на изпитвателната процедура настъпи спонтанно запалване,

или

— има отделяне на запалим газ със скорост, по-голяма от 1 литър/kg вещество за един час.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Протоколът с резултатите от изпитването трябва по възможност да съдържа следната информация:

— точно определение на веществото (вид и примеси),

— детайлно описание на първоначалното приготвяне на изпитваното вещество,

▼B

- резултати от изпитванията (стъпки 1, 2, 3 и 4),
- химична природа на отделения газ,
- скорост на отделяне на газа, ако е била изпълнена стъпка 4 (1.6.4),
- всички допълнителни бележки, свързани с интерпретирането на резултатите.

4.

ПРЕПРАТКИ

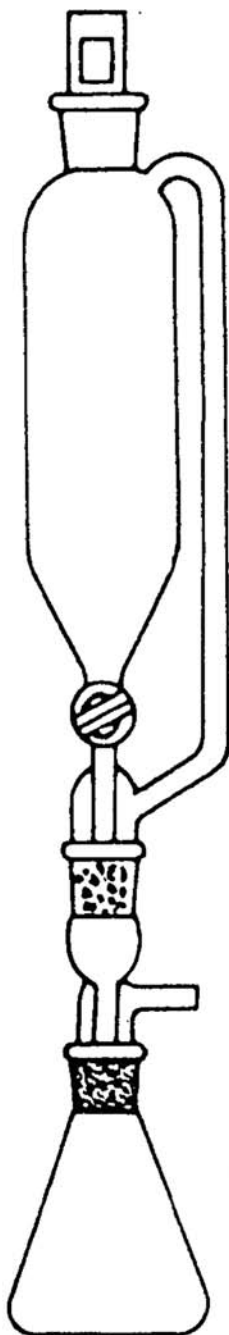
- (1) Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.
- (2) NF T 20-040 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼ B

Допълнение

Фигура

Апаратура



▼B**A.13. ПИРОФОРНИ СВОЙСТВА НА ТВЪРДИ ВЕЩЕСТВА И ТЕЧНОСТИ****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Процедурата за изпитване се прилага за твърди и течни вещества, които се запалват спонтанно на стайна температура (около 20 °C), малко след като са влезли в контакт с въздуха.

Веществата, които трябва да бъдат изложени на въздух за часове или дни при стайна температура или при нарастващи температури преди да се запалят, не са обект на изпитване по този метод.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Счита се, че пирофорни свойства притежават вещества, които се запалват или овъгляват при условията, описани в 1.6.

Самозапалването на течности може да се изпитва също и по метод А.15 Температура на самозапалване (течности и газове).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Не са определени.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Веществото, твърдо или течено, се смесва с инертен носител и се довежда в контакт с въздуха при температурата на околната среда за период от пет минути. Ако течните вещества не се запалят, те се абсорбират върху филтърна хартия и се излагат на въздух при температурата на средата (около 20 °C) за пет минути. Ако твърдото вещество или течността се запалят или ако течността се запали или овъгли филтърната хартия, веществото се счита за пирофорно.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Повторяемост: с оглед на безопасността един положителен резултат се счита за достатъчен за причисляване на веществото към пирофорните вещества.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ**1.6.1. Апаратура**

Порцеланова чашка с диаметър към 10 cm се запълва с диатомит до височина приблизително 5 mm при стайна температура (около 20 °C).

Забележка:

Диатомитът или друго подобно леснодостъпно инертно вещество се приема за представител на почвата, върху която изпитваното вещество може да се разлее в случай на злополука.

За изпитването на течности, които не се запалват на въздуха, ако са в контакт с инертен носител, е необходимо да се използва суха филтърна хартия.

▼B**1.6.2. Провеждане на изпитването****а) Прахообразни твърди вещества**

От 1 до 2 cm³ от изпитваното вещество се изсипват от височина около 1 m върху негоряща повърхност и се наблюдава дали веществото се запалва по време на падането или в рамките на пет минути след това.

Процедурата се повтаря шест пъти, освен ако преди това не настъпи запалване.

б) Течности

Около 5 cm³ от изпитваната течност се изливат в предварително приготвена порцеланова чашка и се наблюдава дали веществото ще се запали в рамките на пет минути.

Ако след шесткратно повторение на тази процедура не настъпи запалване, се провежда следното изпитване:

0,5 ml от изпитваната проба се изпръскват от спринцовка върху нагъната филтърна хартия и се следи дали филтърната хартия ще се запали или ще се овъгли в рамките на пет минути след прибавянето на течността. Опитът се повтаря три пъти, освен ако запалването или овъгляването на хартията не настъпи по-рано.

2. ДАННИ**2.1. ОБРАБОТВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Изпитването се прекратява веднага след получаване на положителен резултат при някой от опитите.

2.2. ОЦЕНКА НА ДАННИТЕ

Ако веществото, смесено с инертен носител, се запали до пет минути след като е изложено на въздуха или ако течността овъгли или изгори филтърната хартия до пет минути след като е накапана върху нея и изложена на въздуха, съответното вещество се счита за пирофорно.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Протоколът с резултатите трябва по възможност да съдържа следната информация:

- точно определение на веществото (вид и примеси),
- резултати от изпитванията,
- всички допълнителни бележки, свързани с интерпретирането на резултатите.

4. ПРЕПРАТКИ

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



A.14. ЕКСПЛОЗИВНИ СВОЙСТВА

1. МЕТОД

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Методът предоставя експериментална схема, предназначена да определи дали дадено твърдо или пастообразно вещество е експлозивно, когато е подложено на действието на пламък (термична чувствителност) или на удар, или триене (чувствителност към механични въздействия) и дали дадена течност може да експлодира под действието на пламък или при удар.

Методът се състои от три части:

- a) изпитване на термичната чувствителност (1);
- б) изпитване на механичната чувствителност при удар (1);
- в) изпитване на механичната чувствителност при триене (1).

Методът осигурява данни за оценка на вероятността да се причини експлозия чрез някое обичайно въздействие. Той не е предназначен да установява дали веществото може да експлодира при всякакви условия.

Методът е подходящ за определяне дали едно вещество е експлозивно (термична и механична чувствителност) при точно определените условия, посочени в директивата. Той се базира на различни типове апарати, широко използвани в много страни (1), които обикновено дават значими резултати. Трябва да се признае, че методът не е окончателен. При него може да се използва и алтернативна апаратура, освен описаната, в случай че тя е международно утвърдена и може да се направи адекватна връзка между получените резултати и тези, получени с установената апаратура.

Когато достъпните термодинамични данни (например топлина на образуване, топлина на разлагане) и/или отсъствието на някои функционални групи (2) в структурната формула показват извън всякакво съмнение, че веществото не може да се разлага бързо с отделяне на газове или освобождаване на топлина (т.е. материалът не е експлозивен), не е необходимо да се провеждат изпитвания. За течностите не се изисква изпитване на механична чувствителност при триене.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Експлозивни:

за експлозивни се считат вещества, които могат да експлодират при действието на пламък или които са чувствителни към удар или триене в определената апаратура (или проявяват по-голяма механична чувствителност от 1,3-динитробензена в алтернативна апаратура).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

За методите с триене и удар като сравнително вещество се използва кристален 1,3-динитробензен с техническа чистота, пресят до размер на частиците 0,5 mm.

За втората серия от изпитвания с триене и удар се използва перхидро-1,3,5-тринитро-1,3,5-триазин (RDX, хексоген, циклонит — CAS 121-82-4), прекристализиран от воден цеклохексанон, пресят във влажно състояние през 250 µm, съхраняван над сито от 150 µm и изсушен при 103 ± 2°C (за 4 часа).

▼B**1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА**

За да се определят условията за безопасното провеждане на трите изпитвания на чувствителността, е необходимо да се проведат предварителни изпитвания.

1.4.1. Определяне на условията за безопасна работа (3)

С оглед на безопасността преди провеждането на основните изпитвания много малки проби (около 10 mg) от веществото се подлагат на нагряване на открито с газова горелка, на удар в някакъв подходящ по форма апарат и на триене с дървен чук върху наковалня или в каква да е по форма фрикционна машина. Целта е да се установи дали веществото е толкова чувствително и експлозивно, че предписаните изпитвания, по-специално тези за термичната чувствителност, трябва да се провеждат със специални предпазни мерки, така че да се избегне нараняването на оператора.

1.4.2. Термична чувствителност

Методът включва нагряване на веществото в стоманена тръба, закрыта с пластинки с отвори с различен диаметър на дупките, при което се определя дали веществото може да експлодира в условията на интензивно нагряване в затворено пространство.

1.4.3. Механична чувствителност (удар)

Методът включва подлагане на веществото на удар с точно определена маса, която се пуска върху него от определена височина.

1.4.4. Механична чувствителност (триене)

Методът включва подлагане на твърдото или пастообразно вещество на триене между стандартни повърхности при определени условия на натиск и относителна скорост на движение.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Не са дадени.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**1.6.1. Термична чувствителност (ефект от пламък)****1.6.1.1. Апаратура**

Апаратът се състои от стоманена тръба за еднократна употреба със затварящи приспособления за многократна употреба (фигура 1), инсталирана в нагревателно защитно устройство. Всяка тръба е направена от лист закалена стомана (вж. допълнението) и има вътрешен диаметър 24 mm, дължина 75 mm и дебелина на стената 0,5 mm. На отворения край на тръбите са монтирани фланци, които позволяват затварянето на тръбите с перфорирани плочи. Приспособлението за затваряне се състои от плочка с централен отвор, устойчива на високо налягане, закрепена здраво за тръбата с помощта на винтово съединение от две части (гайка и резбована втулка). Гайката и резбованата втулка са направени от хромово-магнезиева стомана (вж. допълнението), която не дава искри до 800 °C. Плочките с отворите са с дебелина 6 mm и са направени от термоустойчива стомана (вж. допълнението). Те могат да имат различен диаметър на отворите.

▼ B1.6.1.2. *Условия на изпитването*

Обикновено веществата се изпитват във вида, в който са получени, макар че в някои случаи, например ако са пресовани, в отлята форма или сбити по някакъв друг начин, може да се наложи да се натрошат преди изпитването.

За твърдите вещества количеството материал, което ще се използва при всяко изпитване, се определя като се използва двуетапна подготвителна процедура. Празна тръба се напълва с 9 cm^3 вещество, което се трамбова със сила 80 N, приложена към цялото напречно сечение на тръбата. За по-голяма безопасност или ако физичната форма на пробата може да се промени при натиск, могат да се използват други способности за пълнене на тръбата, например ако веществото е много чувствително на триене, трамбоването не е подходящо. Ако материалът се свие, се прибавя още от него и отново се трамбова, докато тръбата се изпълни до височина 55 mm от горния край. Определя се масата на веществото, необходима да запълни тръбата до това ниво (55 mm). Още на два пъти се прибавя по толкова вещество, което се трамбова също със сила 80 N. След това се прибавя още материал чрез трамбоване или ако е необходимо, се изважда, докато тръбата се напълни на височина 15 mm от горния край. Провежда се второ пробно пълнене на тръбата, като се започне с една трета от количеството, използвано за запълването ѝ при първата проба. Прибавя се още два пъти същото количество вещество при трамбоване с 80 N и нивото на веществото се нагласява на 15 mm от горния край, като се добавя или изважда от материала. При следващите изпитвания се използва количеството вещество, определено при второто пробно пълнене на тръбата. Тръбата се пълни, като на три пъти се прибавят равни количества вещество и всеки път обемът на веществото се довежда до 9 cm^3 чрез натиск с каквато сила е необходима. (Процедурата може да се улесни, като се използват ограничителни пръстени.)

Течностите и гелове се изсипват в тръбата до височина 60 mm, като се внимава, особено при гелове, да не се образуват кухини. Долният край на резбованата втулка се приплъзва върху тръбата, поставя се подходяща плочка с отвор и след като се смаже с малко масло на основата на молибденов дисулфид, гайката се затяга. Важно е да се провери да няма от изпитваното вещество между фланеца и пластинката, а също и в гънките на резбата.

Нагриването става с пропан от индустриална бутилка, снабдена с регулатор на налягането (60 до 70 mbar) през дозатор. Пропанът се разпределя равномерно (което се разбира визуално, като се наблюдават пламъците на горелките) чрез тръба с разклонения към четирите горелки. Горелките са разположени около изпитателната камера, както е показано на фигура 1. Четирите горелки общо изразходват около 3,2 литра пропан на минута. Могат да се използват и други горивни газове и горелки, но скоростта на нагриване трябва да бъде такава, каквато е описана на фигура 3. При всички апарати скоростта на нагриване трябва да се проверява периодично, като се използват тръби, напълнени с дибутилфталат, както е отбелязано на фигура 3.

1.6.1.3. *Провеждане на изпитванията*

Всяко изпитване се провежда, докато тръбата се пръсне на парчета. Ако това не стане, нагриването продължава не повече от пет минути. Изпитването, което довежда до фрагментиране на тръбата на три или повече парчета (в някои случаи парчетата са свързани помежду си с тънки ивици метал, както е показано на фигура 2), се отчита като експлозия. За изпитване, при което се получават по-малко парчета или изобщо не настъпва фрагментация, се счита, че не е довело до експлозия.

▼B

Най-напред се прави серия от три изпитвания с плочки с диаметър на отворите 6,0 mm. Ако не се получи експлозия, се провежда втора серия от три изпитвания с диаметър на отвора 2,0 mm. Ако по време и на двете серии от изпитвания се получат експлозии, не се правят повече изпитвания.

1.6.1.4. *Оценка на резултатите*

Изпитването се счита за положително, ако и при двете описани по-горе серии от изпитвания се получат експлозии.

1.6.2. **Механична чувствителност (удар)**1.6.2.1. *Апарат (фигура 4)*

Най-важните части на един типичен апарат с падащ чук са следните: блок от лята стомана с основа, наковалня, колона, водачи, подвижни тежести, устройство за освобождаване и държател на пробата. Стоманената наковалня с размери 100 mm (диаметър) x 70 mm (височина) е завинтена за горния край на стоманен блок с размери 230 mm (дължина) x 250 mm (ширина) x 200 mm (височина), който има излята основа с размери 450 mm (дължина) x 450 mm (ширина) x 60 mm (височина). Колона, направена от закалена стоманена тръба без спойки, е закрепена здраво с държател, завинтен към задната част на стоманения блок. Четири винта задържат апарата към монолитен бетонен блок с размери 60 x 60 x 60 cm, така че водещите релси да са съвършено вертикални и подвижните тежести да падат свободно (използват се тежести от 5 и 10 kg, направени от плътна стомана). Удрящата повърхност на тежестите е от закалена стомана, HRC от 60 до 63 и има минимален диаметър 25 mm.

Измерваната проба е затворена в ударно устройство, съставено от два коаксиални цилиндъра от плътна стомана, разположени един над друг в кух цилиндричен водещ жлеб (също от стомана). Стоманените цилиндри трябва да бъдат с диаметър 10 (- 0,003, - 0,005) mm и височина 10 mm, да имат полирани повърхности, заоблени краища (радиус на кривината 0,5 mm) и твърдост на HRC от 58 до 65. Кухият цилиндър трябва да бъде с външен диаметър 16 mm, полиран отвор от 10 (+ 0,005, + 0,010) mm и височина 13 mm. Ударното устройство е монтирано върху междинна наковалня (26 mm диаметър и 26 mm височина), направена от стомана и центрована с помощта на пръстен с отвори, които позволяват изпускането на парите.

1.6.2.2. *Условия на изпитването*

Обемът на пробата трябва да бъде 40 mm³ или да е подходящо подбран при използването на алтернативни апарати. Твърдите вещества се измерват в сухо състояние и трябва да се подготвят по следния начин:

- a) стритите вещества се пресяват през сито с размер на отворите 0,5 mm; целият материал, преминал през ситото, се използва за изпитването;
- b) пресованите, излети или сбити по друг начин вещества се натрошават на малки парченца и се пресяват; пресетите частици с размери между 0,5 и 1 mm в диаметър се използват при изпитването и се смятат за представителна фракция на първоначалното вещество.

Веществата, които се доставят в пастообразна форма, се изпитват в сухо състояние. Ако това не е възможно, трябва да се отстрани колкото може по-голямо количество от разредителя. Течностите се изпитват като между долния и горния стоманен цилиндър се оставя пролука от 1 mm.

▼B1.6.2.3. *Провеждане на изпитванията*

Провежда се серия от шест изпитвания, като тежест с тегло 10 kg се пуска от височина 0,40 m (40 J). Ако при тези шест опита се получи експлозия, се провежда нова серия, също от шест изпитвания, но като маса с тегло 5 kg се пуска от височина 0,15 m (7,5 J). В друг апарат пробата се сравнява с избрано сравнително вещество, като се използва предварително установена процедура (например техниката up-and-down или друга).

1.6.2.4. *Оценка на резултатите*

Резултатите от изпитванията се считат за положителни, ако протече експлозия (избухване в пламъци или изгърмяване се равняват на експлозия) поне веднъж при някой от опитите с утвърдения апарат, или ако пробата е по-чувствителна от 1,3-динитробензен или от циклонит при алтернативен начин на изпитване.

1.6.3. **Механична чувствителност (триене)**1.6.3.1. *Апарат (фигура 5)*

Фрикционният апарат се състои от основна плоча, излята от стомана, върху която е монтирано фрикционното устройство. То се състои от фиксиран порцеланов пестик и подвижна порцеланова плочка. Порцелановата плочка е поставена в шейна, която се движи в два водача. Шейната е свързана с електромотор чрез свързващ лост, ексцентрик и подходяща зъбна предавка, така че порцелановата плочка да се придвижва само един път назад и напред под пестика на разстояние 10 mm. Порцелановият пестик може да се натовари например със 120 или 360 нютона.

Плоската порцеланова плочка се изработва от бял технически порцелан (граповост от 9 до 32 μm) и е с размери 25 mm (дължина) x 25 mm (ширина) x 5 mm (височина). Цилиндричният порцеланов пестик също се прави от бял технически порцелан и е дълъг 15 mm, диаметърът му е 10 mm, краищата му са грапави и имат сферична форма с радиус на кривината 10 mm.

1.6.3.2. *Условия на изпитването*

Обемът на пробата трябва да бъде 10 mm³ или друг подходящ за алтернативния апарат.

Твърдите вещества се измерват в сухо състояние и се подготвят, както следва:

- a) стритите вещества се пресяват през сито с размер на отворите 0,5 mm; целият материал, преминал през ситото, се използва за измерването;
- б) пресованите, излети или сбити по друг начин вещества се натрошават на малки парченца и се пресяват; пресетите частици с размери < 0,5 mm в диаметър се използват при изпитването.

Веществата, които обикновено се доставят в пастообразна форма, се изпитват, ако е възможно, в сухо състояние. Ако веществото не може да се приготви в сухо състояние (след отстраняване на максималното възможно количество от разредителя), то се изпитва под формата на филм с дебелина 0,5 mm, ширина 2 mm и дължина 10 mm, направен в матрица.

▼B

1.6.3.3. *Провеждане на изпитванията*

Порцелановият пестик се довежда върху изпитваната проба и се натоварва. По време на изпитването грапавините на порцелановата плочка трябва да са разположени напърно на посоката на движението. Трябва да се внимава за следното: пестикът да се опира върху пробата, под него да има достатъчно количество изпитван материал и плочката да се придвижва правилно под пестика. Пастообразните вещества се нанасят върху плочката с помощта на уред с дебелина 0,5 mm и прорез с размери 2 x 10 mm. Порцелановата плочка трябва да изминава 10 mm напред и назад под пестика за време 0,44 секунди. Всяка от повърхностите на плочката и на пестика се използва само веднъж; двата края на всеки пестик служат за два опита, а всяка от двете повърхности на плочката служи за три опита.

Провежда се серия от шест измервания с товар от 360 N. Ако по време на тези шест опита се получи положителен резултат, се провежда серия от нови шест измервания при натоварване 120 N. При други апарати пробата се сравнява с избрано сравнително съединение, като се използва утвърдена процедура (например техниката up-and-down или друга).

1.6.3.4. *Оценка на резултатите*

Резултатът от изпитването се смята за положителен, ако се получи експлозия (прашине и/или гръм или избухване в пламъци са равностилни на експлозия) поне веднъж при всеки от опитите с утвърдената фриксионна апаратура, или ако задоволява еквивалентните критерии при алтернативно изпитване.

2. **ДАНИИ**

По принцип се счита, че едно вещество е експлозивно по смисъла на директивата, ако е получен положителен резултат при изпитването на термичната чувствителност или на чувствителността при удар или при триене.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**3.1. **ИЗПИТВАНЕ**

Протоколът от изпитването трябва по възможност да съдържа следната информация:

- вид, състав, чистота, съдържание на влага и т.н. на изпитваното вещество,
- физична форма на пробата и дали тя е била натрошавана, чупена и/или пресявана,
- наблюдения по време на изпитванията на термичната чувствителност (например маса на пробата, брой на фрагментите и др.),
- наблюдения при изпитването на механичната чувствителност (образуване на значително количество дим или пълно разлагане с взрив, пламъци, искри, гърмеж, прашине и т.н.),
- резултати от всеки вид изпитвания,
- ако е използван алтернативен апарат, трябва да се представи научна обосновка, както и доказателство за корелацията между резултатите, получени с утвърдения апарат, и тези, получени с еквивалентния апарат,

▼B

- всички полезни коментари, като например позоваване на изпитвания на подобни продукти, които може да се отнасят до правилното интерпретиране на резултатите,
- всички допълнителни бележки, свързани с интерпретирането на резултатите.

3.2. ИНТЕРПРЕТИРАНЕ И ОЦЕНКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

В протокола от изпитванията трябва да са посочени всички резултати, които са сметнати за погрешни, аномални или непредставителни. Ако някой от резултатите е отхвърлен, трябва да се даде обяснение, както и резултатите от всички алтернативни или спомагателни изпитвания. В случай че отхвърлянето на даден аномален резултат не може да се обясни, той трябва да се приеме за действителен и да се използва при класифицирането на веществото.

4. ПРЕПРАТКИ

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



Допълнение

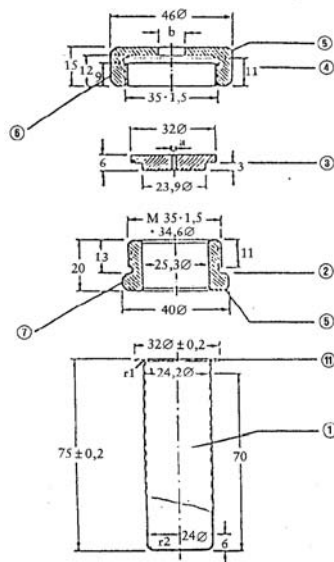
Пример за спецификация на материалите за изпитването на термичната чувствителност (вж. DIN 1623)

- (1) Тръба: спецификации на материалите № 1.0336.505 g
- (2) Плочка с отворстия: спецификация на материалите № 1.4873
- (3) Резбована втулка и гайка: спецификация на материалите № 1.3817

Фигура 1

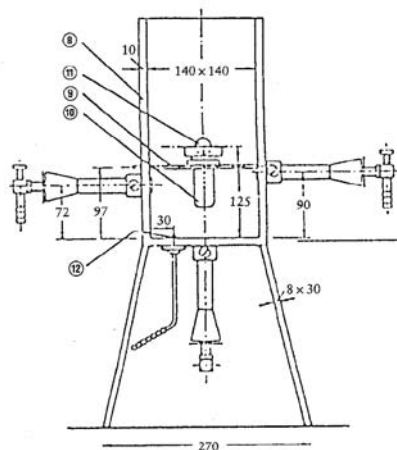
Апарат за измерване на термичната чувствителност

(всички размери са в милиметри)



Фиг. 1а Стоманена тръба и спомагателни приспособления

- (1) тръба
- (1a) външен фланец
- (2) резбована втулка; резба с ниска степен на триене
- (3) плочка с отвор $a = 2,0$ или $6,0$ mm в диаметър
- (4) гайка $B = 10$ mm в диаметър
- (5) повърхност с жлебове
- (6) две плоскости за гаечен ключ размер 41



Фиг. 1б Нагревателни и защитни приспособления

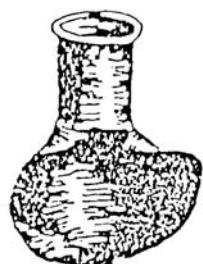
- (7) две плоскости за гаечен ключ размер 36
- (8) камера, предпазваща от летящи парчета
- (9) два подпорни лоста за тръбата
- (10) сглобена тръба
- (11) място на задната горелка; останалите горелки се виждат
- (12) контролна дюза

▼B

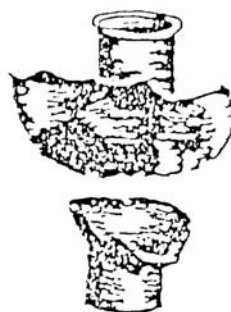
Фигура 2

Изпитване на термичната чувствителност

(примери за фрагментиране)



Няма експлозия



Няма експлозия



Експлозия



Експлозия



Експлозия

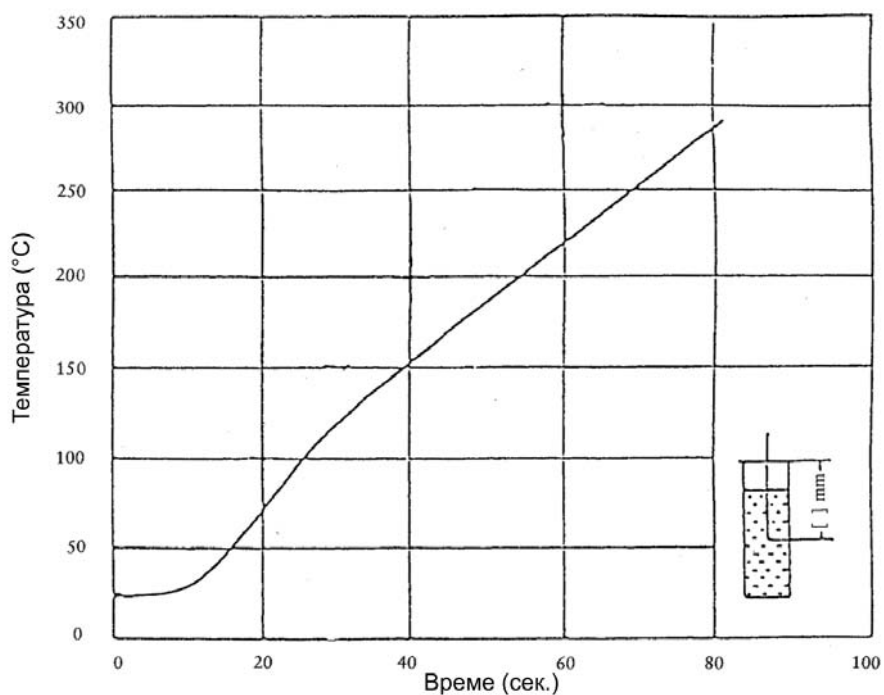


Експлозия

▼В

Фигура 3

Калибриране на скоростта на нагряване за изпитването на термичната чувствителност



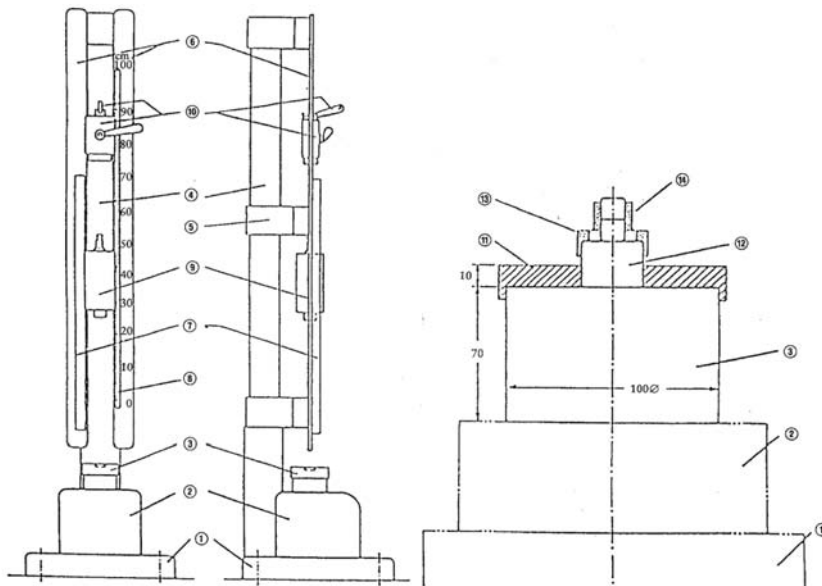
Крива температура/време, получена при нагряването на дибутилфталат (27 cm^3) в затворена тръба (с плоча с отвор $1,5 \text{ mm}$) посредством пропанов пламък със скорост $3,2 \text{ l/min}$. Температурата е измерена с хромалумелова термодвойка, обшита с неръждаема стомана с диаметър 1 mm и разположена централно на разстояние 43 mm под пръстена на тръбата. Скоростта на нагряване между $135 \text{ }^\circ\text{C}$ и $285 \text{ }^\circ\text{C}$ трябва да бъде между 185 и 215 K/минута .

▼В

Фигура 4

Апарат за изпитване на удар

(всички размери са в милиметри)



Фиг. 4а Падащ чук, отпред и отстрани, общ изглед

- (1) основа, 450 x 450 x 60
- (2) стоманен блок 230 x 250 x 200
- (3) наковалня 100 диаметър x 70
- (4) колона
- (5) междинен напречен елемент
- (6) два водача
- (7) зъбчата рамка

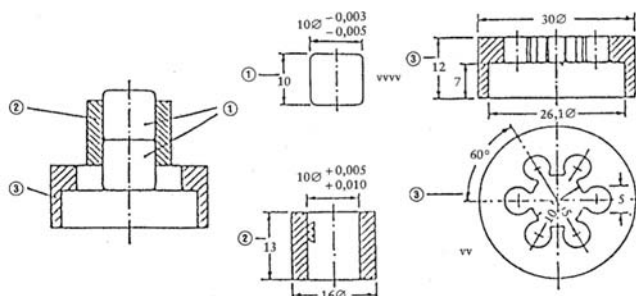
Фиг. 4б Падащ чук, долна част

- (8) градуирана скала
- (9) падащ чук (падаща маса)
- (10) подпорно и освобождаващо устройство
- (11) локализираща плоча
- (12) междинна наковалня (заменяема), 26 диаметър x 26
- (13) локализиращ пръстен с отвори
- (14) ударно устройство

▼В

Фигура 4

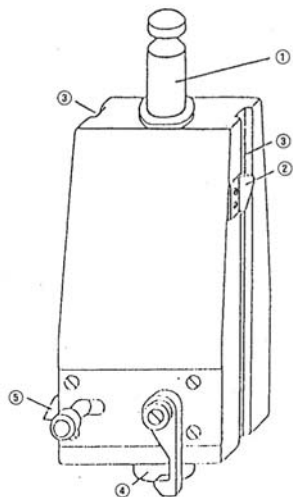
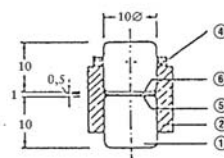
Продължение



Фиг. 4в Устройство за удар върху вещества в прахообразна или пастообразна форма

- (1) стоманен цилиндър
- (2) водещ пръстен за стоманените цилиндри
- (3) локализиращ пръстен с отвори
 - (а) вертикален срез
 - (б) хоризонтален срез
- (4) гумен пръстен
- (5) течност (40 mm³)
- (6) пространство без течност

Фиг. 4г Ударно устройство за течни вещества



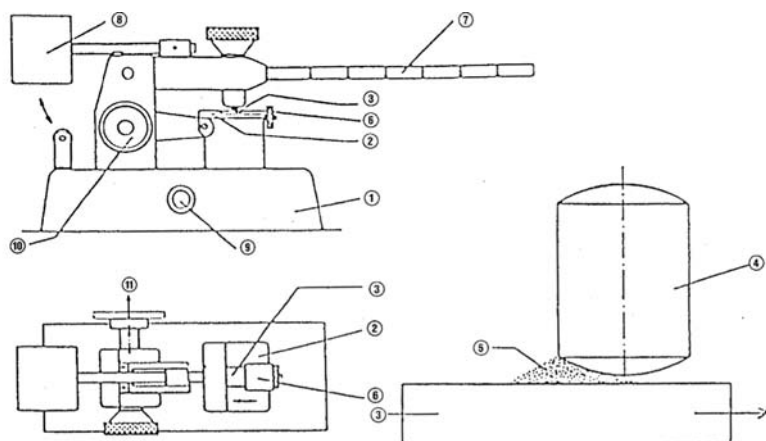
Фиг.4д Чук (падаща маса от 5 kg)

- (1) висящ кран
- (2) приспособление за маркиране на височината
- (3) позиционен жлеб
- (4) цилиндрична ударна глава
- (5) запиращо езиче

▼B

Фигура 5

Апарат за чувствителност при триене



Фигура 5а Фрикционен апарат; вертикален и хоризонтален изглед

- (1) стоманена основа
- (2) подвижна шейна
- (3) порцеланова плочка, 25 x 25 x 5 mm, закрепена на шейната
- (4) фиксиран порцеланов пестик, 10 диаметър x 15 mm
- (5) изпитвано вещество, приблизително 10 mm³

Фиг. 5б Стартова позиция на пестика върху пробата

- (6) държач за пестика
- (7) товарно рамо
- (8) противотежест
- (9) копче за включване и изключване
- (10) колело за нагласяване на шейната на стартова позиция
- (11) посока към електродвигателя

▼B**A.15. ТЕМПЕРАТУРА НА САМОЗАПАЛВАНЕ (ТЕЧНОСТИ И ГАЗОВЕ)****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Това изпитване не се отнася за експлозивни вещества, както и за веществата, които се samozапалват при контакт с въздуха на стайна температура. Процедурата за изпитване е приложима за газове, течности и пари, които в присъствието на въздух могат да се запалят от нагорещена повърхност.

Температурата на samozапалване може да бъде понижена значително при използване на примеси с каталитични свойства, от материала на нагорещената повърхност или поради това, че обемът на измервателния съд е твърде голям.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Степента на samozапалване се изразява чрез температурата на samozапалване. Температурата на samozапалване е най-ниската температура, при която изпитваното вещество се запалва, смесвайки се с въздух при условията, определени в метода.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Веществата за сравнение са посочени в стандартите (вж. 1.6.3). Преди всичко те трябва да служат за периодична проверка на ефикасността на метода, както и да позволяват сравнение с резултатите, получени по други методи.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Методът определя минималната температура на вътрешната повърхност на затворен съд, която води до запалването на газ, пара или течност, впръскани в съда.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Точността зависи от областта, в която се намира температурата на samozапалване, както и от използвания метод за изпитване.

Чувствителността и специфичността зависят от използвания метод за изпитване.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**1.6.1. Апаратура**

Апаратурата е описана в метода, посочен в 1.6.3.

1.6.2. Условия на изпитването

Проба от изпитваното вещество се изпитва по метода, посочен в 1.6.3.

1.6.3. Провеждане на изпитването

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

▼B**2. ДАННИ**

Записват се температурата на изпитването, атмосферното налягане, използваното количество от пробата и времето до момента на запалването.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Протоколът с резултатите от изпитването трябва по възможност да съдържа следната информация:

- точно идентифициране на веществото (вид и примеси),
- количество на пробата; атмосферното налягане,
- използван апарат,
- резултати от изпитванията (температури, при които са проведени изпитванията, резултати, свързани със запалването; съответни времена до запалването),
- всички допълнителни бележки, свързани с интерпретирането на резултатите.

4. ПРЕПРАТКИ

Няма.

▼B**A.16. ОТНОСИТЕЛНА ТЕМПЕРАТУРА НА САМОЗАПАЛВАНЕ НА ТЪВРДИ ВЕЩЕСТВА****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Това изпитване не се отнася за експлозивни вещества, както и за вещества, които се samozапалват при контакт с въздух на стайна температура.

Целта на това изпитване е да се осигури предварителна информация за samozапалването на твърдите вещества при повишаване на температурата.

Ако топлината, която се отделя при взаимодействие на веществото с кислород или при екзотермичното му разлагане, не се разсейва достатъчно бързо в околната среда, се получава самонагриване, което води до samozапалване. Следователно samozапалване настъпва, когато скоростта на топлопроизводството е по-висока от скоростта на топлоотделянето.

Процедурата за изпитване се използва като предварителен скрийнинг-метод за твърди вещества. Като се има предвид сложната същност на процесите на запалване и изгаряне на твърди вещества, определената по този метод температура на samozапалване трябва да се използва само за сравнителни цели.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Температурата на samozапалване, получена по този метод, е минималната температура на околната среда в °C, при която определено количество вещество ще се запали при определени условия.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Определено количество от изпитваното вещество се поставя в пещ при стайна температура; записва се крива температура/ време, регистрираща условията в средата на пробата, докато температурата на пещта се повиши до 400 °C (или до точката на топене на веществото, ако тя е по-ниска) при скорост на повишаване 0,5 °C/min. Във връзка с целта на това изпитване температурата на пещта, при която температурата на пробата достигне 400 °C чрез самонагриване, се нарича температура на samozапалване.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**1.6.1. Апаратура****1.6.1.1. Пещ**

Температурно програмирана лабораторна пещ (еместимост около 2 литра), снабдена с устройство за въздушна циркулация и обезопасена срещу експлозии. За да се избегне потенциалната опасност от взрив, отделените при разлагането на веществото газове не бива да влизат в контакт с електронагревателните елементи.

▼B1.6.1.2. *Куб от телена мрежа*

Парче от телена мрежа с размер на отворите 0,045 mm, направена от неръждаема стомана, се изрязва по начина, показан на фигура 1. Мрежата се сгъва под формата на куб с открит горен край и се закрепва с тел.

1.6.1.3. *Термодвойки*

Подходящи термодвойки.

1.6.1.4. *Записващо устройство*

Двуканално записващо устройство от 0 до 600 °C или за съответното напрежение.

1.6.2. **Условия на изпитването**

Веществата се изпитват във вида, в който са получени.

1.6.3. **Провеждане на изпитването**

Кубът се напълва с изпитваното вещество, стръсква се внимателно и се прибавя още вещество, докато се напълни догоре. След това кубът се окачва в центъра на пещта при стайна температура. Едната от термодвойките се поставя в центъра на куба, а другата — между куба и стената на пещта, за да се отчита температурата на пещта.

Температурите на пещта и на пробата се записват непрекъснато, докато температурата на пещта се повишава до 400 °C или до точката на топене (ако е по-ниска) при скорост на повишаване 0,5 °C/min.

Когато веществото се запали, термодвойката, поставена в него, ще покаже много рязко повишаване на температурата над тази на пещта.

2. **ДАНИИ**

За оценяване се използва температурата на пещта, при която температурата на пробата достигне 400 °C чрез самонагриване (вж. фигура 2).

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Протоколът с резултатите от изпитването трябва по възможност да съдържа следната информация:

- описание на изпитваното вещество,
- резултати от изпитванията, включително кривата температура/време,
- всички допълнителни бележки, свързани с интерпретирането на резултатите.

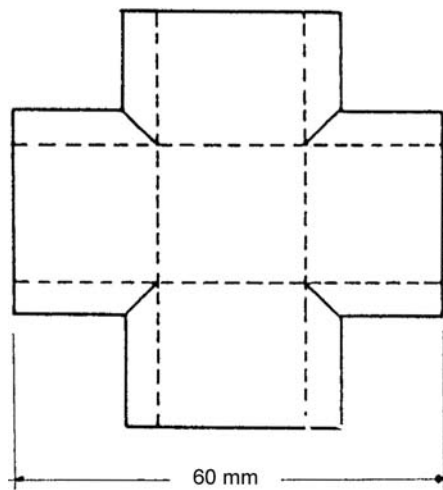
4. **ПРЕПРАТКИ**

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

▼B

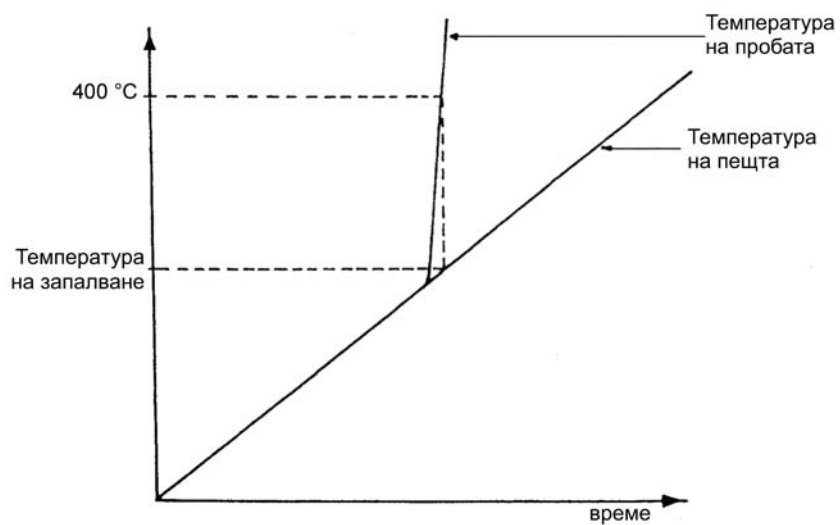
Фигура 1

Модел на измервателния куб с дължина на страната 20 mm



Фигура 2

Типична крива температура/време



▼B**A.17. ОКСИДИРАЩИ СВОЙСТВА (ТВЪРДИ ВЕЩЕСТВА)****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Преди да се проведе това изпитване, ще е от полза да има предварителна информация за евентуалните експлозивни свойства на веществото.

Методът е неприложим за течности, газове, експлозивни или леснозапалими вещества, както и за органични пероксиди.

Провеждането на това изпитване не е необходимо, когато проучването на структурната формула показва без съмнение, че веществото не реагира екзотермично с горивни материали.

За да се разбере дали изпитването трябва да се провежда при специални мерки за сигурност, е необходимо да се направи предварително изпитване.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Време на изгаряне: реакционното време в секунди, необходимо на зоната, в която протича реакцията, да премине по цялата дължина на образеца в съответствие с процедурата, описана в 1.6.

Скорост на изгаряне: изразява се в милиметри за секунда.

Максимална скорост на изгаряне: най-високата стойност на скоростта на изгаряне, получена при смеси, съдържащи от 10 до 90 тегл. % окислител.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

За изпитването, както и за предварителното изпитване, като вещество за сравнение се използва бариев нитрат с аналитична чистота.

Приготвената съгласно точка 1.6 смес от бариев нитрат и прахообразна целулоза се използва като смес за сравнение. Тя има максимална скорост на изгаряне (обикновено това е смес, съдържаща 60 тегл. % бариев нитрат).

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

С оглед на безопасността се провежда предварително изпитване. Ако предварителното изпитване покаже ясно, че изпитваното вещество притежава оксидиращи свойства, не е необходимо да се провеждат повече изпитвания. В противен случай веществото се подлага на пълната процедура за изпитване.

При пълното изпитване изпитваното вещество и определено горивно вещество се смесват в различни съотношения. След това от всяка смес се оформя купчинка, която се запалва от единия край. Така определената максимална скорост на изгаряне се сравнява с тази на сравнителната смес.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Всеки метод на стриване и смесване се приема за валиден, в случай че максималната скорост на изгаряне при шест отделни опита се различава от средноаритметичната с не повече от 10 %.

▼B

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. Подготовка

1.6.1.1. Изпитвано вещество

Размерът на частиците на изпитваното вещество се намалява до < 0,125 mm по следния начин: веществото се пресява, остатъчната фракция се стрива и тази процедура се повтаря, докато цялата проба премине през ситото.

Може да се използват всякакви методи на стриване и пресяване, стига те да са в съответствие с критериите за качество.

Преди да се приготви сместа, веществото се суши при 105 °C до достигане на постоянно тегло. Ако температурата на разлагане на изпитваното вещество е по-ниска от 105 °C, то се суши при подходяща по-ниска температура.

1.6.1.2. Горивно вещество

Като горивно вещество се използва прахообразна целулоза. Целулозата трябва да бъде от вид, използван за тънкослойна или за колонна хроматография. Целулоза с дължини на нишките, по-големи от 85 % между 0,020 и 0,075 mm, е подходяща за целта. Разпрашената целулоза се прокарва през сито с размер на порите 0,125 mm. По време на цялото изпитване се използва една и съща партида целулоза.

Преди приготвянето на сместа прахообразната целулоза се суши при 105 °C до постоянно тегло.

Ако при предварителното изпитване се използва дървесно брашно, то трябва да се приготви от влажна дървесина, като се събере порцията, която преминава през сито с размер на отворите 1,6 mm, разбърква се добре и се суши 4 часа при 105 °C на пласт, не по-дебел от 25 mm. След това се охлажда и се съхранява до употребата в обезвъздушен контейнер, запълнен колкото е възможно повече. За предпочитане е да се използва в рамките на 24 часа след сушенето.

1.6.1.3. Източник на възпламеняване

Като източник на възпламеняване се използва горещ пламък от газова горелка (минимален диаметър 5 mm). Ако се използва друг източник (например при изпитване в инертна атмосфера), той трябва да се опише и използването му да се обоснове.

1.6.2. Провеждане на изпитването

Забележка:

Смесите от окислител и целулоза или дървесно брашно трябва да се третират като потенциално експлозивни и с тях да се работи със съответното внимание.

1.6.2.1. Предварително изпитване

Сухото вещество се смесва добре с изсушената целулоза или дървесно брашно в тегловно съотношение 2 към 1 и сместа се оформя като малка конусовидна купчинка с размери 3,5 cm (диаметър на основата) x 2,5 cm (височина). Оформянето на купчинката става чрез пълнене и трамбоване в конусообразна матрица (например лабораторна стъклена фуния със запушен ствол).

▼ B

Купчинката се поставя върху хладка незапалима гладка плоча с ниска топлопроводимост. Изпитването се провежда във вентилационен шкаф, както е описано в 1.6.2.2.

Източникът на възпламеняване се допира до конуса. Интензивността и продължителността на получената реакция се наблюдават и записват.

Ако реакцията е бурна, веществото се счита за оксидиращо.

В случай че резултатът буди съмнение, е необходимо да се проведе цялата поредица от процедури, описана по-долу.

1.6.2.2. *Последователност на изпитвателните процедури*

Приготвят се смеси от сухото вещество и целулозата със съдържание на сухо вещество от 10 до 90 тегл. %, като концентрацията на веществото нараства с по 10 % при всяка следваща смес. В случай че резултатите са на границата на две концентрации, за да се получи по-точна стойност на максималната скорост на изгаряне, трябва да се приготвят и смеси с междинно съдържание.

Купчинката се оформя с помощта на матрица. Матрицата е направена от метал, има дължина 250 mm, триъгълно напречно сечение с височина 10 mm и вътрешна ширина 20 mm. От двете страни на матрицата в надлъжна посока се монтират две метални пластинки като латерални ограничители, които изпъкват с по 2 mm над горния край на триъгълното сечение (вж. фигурата). В това приспособление се насипва свободно малък излишък от сместа. След като матрицата се пусне веднъж от височина 2 cm върху твърда повърхност, излишното вещество се изстъргва с помощта на наклонен лист, латералните ограничители се снемат и останалият прах се заглажда с валик. След това върху матрицата се поставя плоча от незапалим непорьозен материал с ниска топлопроводимост, приспособлението се обръща и матрицата се отстранява.

Купчинката се поставя срещу въздушен поток във вентилационен шкаф.

Скоростта на въздушния поток трябва да е достатъчно висока, за да се избегне проникването на дим в лабораторията. Тя не бива да се променя по време на изпитването. Около апарата се издига защитен екран.

Тъй като целулозата, както и някои изпитвани вещества, са хигроскопични, изпитването трябва да се проведе колкото е възможно по-бързо.

Единият край на купчинката се запалва чрез допиране на пламък.

След като зоната на реакцията се разпространи на първоначално разстояние от 30 mm, се измерва времето на реакцията за следващите 200 mm.

Провежда се изпитване със сравнително вещество и поне по едно изпитване със смесите на веществото с целулоза с концентрации в определената област.

Ако максималната скорост на изгаряне се окаже значително по-висока от тази на сместа за сравнение, изпитването се прекратява; в противен случай то се провежда по пет пъти за всяка от трите смеси с най-високи скорости на изгаряне.

▼ B

Ако има съмнение, че полученият положителен резултат не е реален, изпитването трябва да се повтори, като вместо целулоза се използва инертно вещество с подобен размер на частиците, например кизелгур. Също така изпитването на сместа (изпитвано вещество-целулоза) с най-висока скорост на изгаряне трябва да се повтори в инертна атмосфера (< 2 об. % съдържание на кислород).

2. ДАННИ

От съображения за безопасност като характеристика за оксидиращите свойства на изпитваното вещество се приема максималната скорост на изгаряне, а не средната стойност на скоростта на изгаряне.

За оценяване се използва най-високата стойност на скоростта на изгаряне, получена след шест опита с определена смес.

Начертава се графика на най-високите стойности на скоростта на изгаряне за всяка смес към концентрациите на окислителя. От графиката се сема максималната скорост на изгаряне.

Шестте измерени стойности на скоростта на изгаряне, получени при един опит със сместа с най-висока скорост на изгаряне, не трябва да се различават от средноаритметичната стойност с повече от 10 %; в противен случай методите на стриване и смесване трябва да се подобрят.

Сравнява се получената максимална скорост на изгаряне с тази на сравнителното вещество (вж. 1.3).

Ако изпитванията се провеждат в инертна атмосфера, максималната скорост на реакцията се сравнява с тази на сместа за сравнение също в инертна атмосфера.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Протоколът от изпитването трябва по възможност да съдържа следната информация:

- вид, състав, чистота, влагосъдържание и т.н. на изпитваното вещество,
- всяка обработка на изпитваното вещество (например стриване, сушене и т.н.),
- източник на възпламеняване, използван при изпитването,
- резултати от изпитванията,
- начин на протичане на реакцията (например пламък, горящ на повърхността, изгаряне в цялата маса на веществото, информация, свързана с продуктите на изгарянето),
- всички допълнителни бележки относно интерпретацията на резултатите, включително описание на интензивността на реакцията (пламъци, искри, дим, бавно тлеене и т.н.) и приблизителната продължителност, получена при предварителния скрийнинг, както за изпитваното, така и за сравнителното вещество,
- резултати от изпитвания с инертно вещество, ако има такива,
- резултати от изпитвания в инертна атмосфера, ако има такива.

▼B

3.2. АНАЛИЗ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Едно вещество се счита за оксидиращо, когато:

- а) при предварителното изпитване е протекла бурна реакция;
- б) при провеждането на пълното изпитване максималната скорост на изгаряне на изпитваните смеси е по-голяма или равна на максималната скорост на изгаряне на сместа целулоза-бариев нитрат, използвана за сравнение.

За да се избегне получаването на неверни положителни резултати, получените при изпитване на смесеното с инертен материал вещество и/или при изпитване в инертна атмосфера данни също трябва да се вземат предвид при интерпретиране на резултатите.

4. ПРЕПРАТКИ

NF T 20-035 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

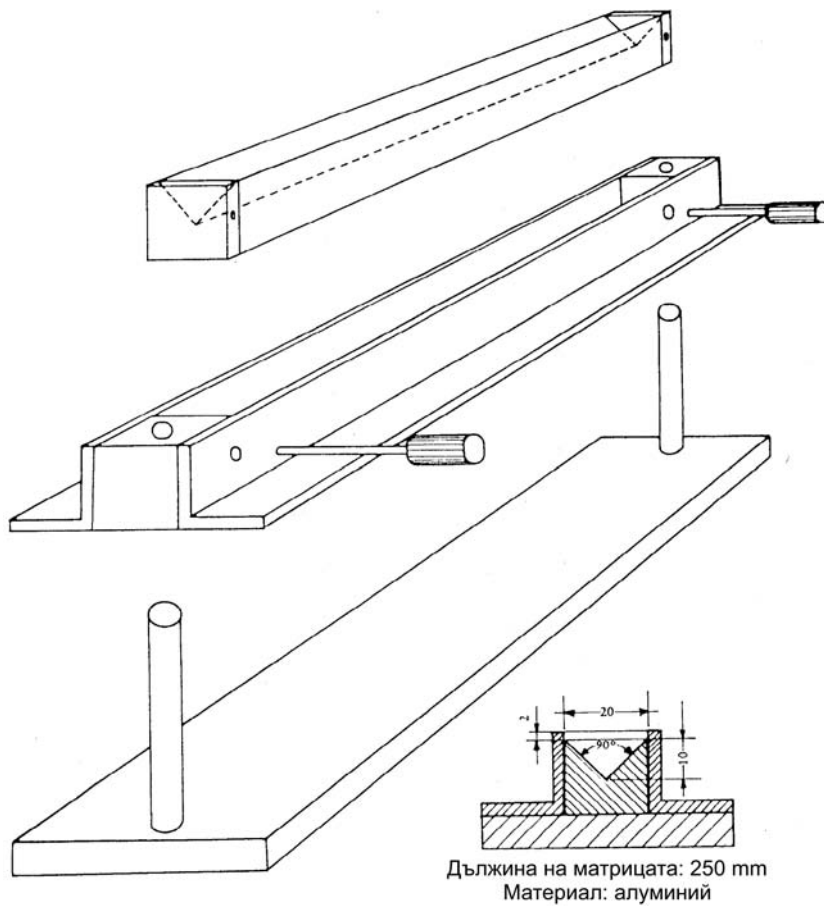
▼B

Допълнение

Фигура

Матрица и спомагателни приспособления за приготвяне на купчинката

(всички размери са в милиметри)



▼B**A.18. СРЕДНО БРОЙНО МОЛЕКУЛНО ТЕГЛО И РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА МОЛЕКУЛНОТО ТЕГЛО НА ПОЛИМЕРИ****1. МЕТОД**

Този хроматографски метод с гел инфилтрация е точно копие на метода ОИСП TG 118 (1996 г.). Основните принципи и по-подробна техническа информация са дадени в препратка (1).

1.1. УВОД

Тъй като свойствата на полимерите са много разнообразни, не е възможно да се опише един-единствен метод, установяващ точно условията за сепарация и оценка, който да обхваща възможностите и спецификата, които се получават при сепарацията на полимерите. В частност сложните полимерни системи често не се поддават на хроматография с гел инфилтрация (GPC). Когато GPC е неприложима, молекулното тегло се определя с помощта на други методи (виж допълнението). В такива случаи пълните подробности и оценката се правят на базата на използвания метод.

Описаният метод се базира на DIN стандарта 55672 (1). В този DIN стандарт може да се намери подробна информация как да се извършат изпитванията и как да се оценят данните. В случай че са необходими модификации на експерименталните условия, тези промени трябва да бъдат оправдани. Могат да се използват и други стандарти, ако са напълно подходящи. Описаният метод използва проби от полистирол с позната полидисперсност за калибровка и може да се наложи да бъде променен, с цел да бъде подходящ за определени полимери, например водоразтворими полимери и полимери с дълги разклонени вериги.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Средното бройно молекулно тегло M_n и средното тегловно молекулно тегло M_w се определят с помощта на следните уравнения:

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

където:

H_i = нивото на детекторния сигнал от базовата линия на обема на задържане V_i ,

M_i = молекулното тегло на полимерната фракция при обема на задържане V_i , и

n = броя на точките с данни.

Широчината на разпределение на молекулното тегло, която е мярка за дисперсността на системата, се изразява чрез съотношението M_w/M_n .

▼ **B**

1.3. ЕТАЛОННИ ВЕЩЕСТВА

Тъй като GPC е относителен метод, трябва да се извърши калибровка. За целта обикновено се използват полистиролови стандарти с линеен строеж и тясно разпределение, с известни средни молекулни тегла M_n и M_w и известно молекулно теглово разпределение. Калибрационната крива може да се използва само при определяне на молекулното тегло на непозната проба, ако условията за разделяне на пробата и стандартите са били подбрани по идентичен способ.

Една установена връзка между молекулното тегло и елуирация обем е валидна само при специфичните условия на даденото изпитване. Условията включват преди всичко температурата, разтворителя (или сместа от разтворители), хроматографските условия и сепарационната колона или система от колони.

Молекулните тегла на пробата, определени по този начин, са относителни стойности и се описват като „полистиролови еквивалентни молекулни тегла“. Това означава, че в зависимост от структурните и химическите различия между пробата и стандартите, молекулните тегла могат да се отклоняват от абсолютните стойности в по-голяма или по-малка степен. Ако се използват други стандарти, например полиетиленгликол, полиетиленов окис, полиметил метакрилат, полиакрилна киселина, трябва да се посочи причината за това.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Както разпределението на молекулното тегло на пробата, така и нейните средни молекулни тегла (M_n , M_w) могат да се определят чрез GPC. GPC е специален тип течна хроматография, при която пробата се сепарира според хидродинамичните обеми на отделните съставни части (2).

Сепарацията се извършва, като пробата преминава през колона, която е пълна с порест материал, обикновено органичен гел. Малките молекули могат да проникват през порите, докато големите молекули не могат. Следователно пътеката на по-големите молекули е по-къса и те елуират първи. Молекулите със среден размер проникват през някои от порите и елуират по-късно. Най-малките молекули, със среден хидродинамичен радиус, по-малък от този на порите на гела, могат да проникват през всички пори. Те елуират последни.

В идеалния случай сепарацията се контролира изцяло от размера на молекулните видове, но на практика е трудно да се избегнат поне някои от абсорбционните ефекти, които смущават процеса. Неравномерната облицовка на колоната и мъртвите обеми могат да влошат ситуацията (2).

Детекцията се извършва например чрез рефрактивен индекс или UV-абсорбция и се получава проста крива на разпределението. За да се прибавят обаче действителните стойности на молекулните тегла към кривата, е необходимо да се калибрира колоната, като през нея се пуснат полимери с познато молекулно тегло и в идеалния случай, с доста широка подобна структура, например различни полистиролови стандарти. Резултатът е типична крива на Gaussian, на места изкривена от малка опашка по посока на страната с ниско молекулно тегло, като вертикалната ос показва количеството по тегло на различните елуирани видове молекулни тегла, а хоризонталната ос показва регистрираното молекулно тегло.

▼B

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Повторяемостта (относителното стандартно отклонение — Relative Standard Deviation (RSD) на елуиращия обем трябва да бъде по-добра от 0,3 %. Желаната повторяемост на анализа трябва да се гарантира чрез корекция през вътрешен стандарт, ако хроматограмата се оценява в зависимост от времето и не отговаря на горепосочените критерии (1). Полидисперсностите зависят от молекулните тегла на стандартите. В случая с полистироловите еталони типичните стойности са:

$$M_p < 2\,000 \qquad M_w/M_n < 1,20$$

$$2\,000 \leq M_p \leq 10^6 \qquad M_w/M_n < 1,05$$

$$M_p > 10^6 \qquad M_w/M_n < 1,20$$

(M_p е молекулното тегло на еталона при максималния пик)

1.6. ОПИСАНИЕ НА ИЗПИТВАТЕЛНИЯ МЕТОД

1.6.1. Подготовка на стандартните полистиролови разтвори

Полистироловите стандарти се разтварят чрез внимателно смесване в избрания елуент. При подготовката на разтворите трябва да се вземат предвид препоръките на производителя.

Концентрациите на избраните стандарти зависят от различни фактори, например обем на инжектиране, вискозитет на разтвора и чувствителност на аналитичния детектор. Максималният обем на инжектиране трябва да се адаптира към дължината на колоната, с цел да се избегне претоварване. Типичните обеми на инжектиране за аналитична сепарация чрез GPC с колона 30 cm x 7,8 mm обикновено са между 40 и 100 μ l. Възможни са и по-големи обеми, но те не трябва да превишават 250 μ l. Оптималното съотношение между обема на инжектиране и концентрацията трябва да се определи преди действителната калибровка на колоната.

1.6.2. Подготовка на разтвора проба

Принципно при подготовката на разтворите проби се прилагат същите изисквания. Мострата се разтваря в подходящ разтворител, например тетраhydroфуран (THF), чрез старателно разклащане. Тя не трябва при никакви обстоятелства да се разтваря с помощта на ултразвукова баня. Когато е необходимо, разтворът проба се пречиства през мембранен филтър с размер на порите между 0,2 и 2 μ m.

Присъствието на неразтворени частици трябва да се отчете във финалния протокол, тъй като тези частици може да се дължат на високомолекулни видове. Трябва да се използва подходящ метод за определяне процента на теглото на разтворените частици. Разтворите трябва да се използват в рамките на 24 часа.

1.6.3. Апаратура

— резервоар за разтворител,

— дегазатор (когато е уместно),

— помпа,

▼B

- гасител на пулсации (когато е уместно),
- инжекторна система,
- хроматографски колони,
- детектор,
- разходомер за дебит (когато е уместно),
- процесор-рекордер за данни,
- съд за отпадъци.

Трябва да се гарантира, че GPC системата е инертна по отношение на използваните разтворители (например чрез използване на стоманени капилари за THF-разтворителя).

1.6.4. Система за инжектиране и подаване на разтворител

Към колоната се подава определен обем разтвор на пробата, автоматично или ръчно, в строго определена зона. Твърде бързото издърпване или натискане на буталото на помпата, ако се прави ръчно, може да причини промени в наблюдаваното разпределение на молекулното тегло. Системата за подаване на разтворител трябва, доколкото е възможно, да няма пулсации, включвайки гасител на пулсации в идеалния случай. Дебитът е от порядъка на 1 ml/min.

1.6.5. Колона

В зависимост от пробата полимерът може да се охарактеризира или с помощта на проста колона, или чрез няколко колони, свързани последователно. На пазара се предлагат порести материали за колони с определени свойства (например размер на порите, лимити на изключване). Изборът на сепарационен гел или на дължина на колоната зависи както от свойствата на пробата (хидродинамични обеми, разпределение на молекулното тегло), така и от специфичните условия за сепарация като разтворител, температура и дебит (1) (2) (3).

1.6.6. Теоретични пластини

Колоната или комбинацията от колони, използвани за сепарация, трябва да се охарактеризират чрез броя на теоретичните пластини. Това включва, в случая на THF като елуиращ разтворител, подаване на разтвор на етилбензол или друг подходящ неполярен разтвор към колона с позната дължина. Броят на теоретичните пластини се определя чрез следното уравнение:

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

където:

N = броя на теоретичните пластини

V_e = елуиращия обем при максималния пик

▼ B

W = пика на широчината на базовата линия

$W_{1/2}$ = пиковата широчина при половин височина.

1.6.7. Сепарационна производителност

Освен броя на теоретичните пластини, който е количество, определящо широчината на зоната, известна роля играе и сепарационната производителност, която се определя от стръмността на калибрационната крива. Сепарационната производителност на една колона се получава от следната зависимост:

$$\frac{V_{ey, M_x} - V_{ey(10M_x)}}{\text{площта на напречно сечение на колоната}} \geq 6,0 \left[\frac{\text{cm}^2}{\text{cm}^3} \right]$$

където:

V_{ey, M_x} = елуирация обем за полистирол с молекулно тегло M_x

$V_{ey(10M_x)}$ = елуирация обем за полистирол с 10 пъти по-голямо молекулно тегло.

Резолюцията на системата обикновено се определя, както следва:

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

където:

V_{e1}, V_{e2} = елуиращите обеми на двата полистиролови стандарта в максималния пик

W_1, W_2 = пиковите широчини в базовата линия

M_1, M_2 = молекулните тегла в максималния пик (трябва да се различават с коефициент 10).

R-стойността на системата колони трябва да бъде по-голяма от 1,7 (4).

1.6.8. Разтворители

Всички разтворители трябва да бъдат с висока чистота (за THF се използва чистота 99,5 %). Резервоарът за разтворител (ако е необходимо в атмосфера от инертен газ) трябва да е достатъчно голям за калибровката на колоната и няколко анализа на проби. Разтворителят трябва да се дегазира, преди да бъде транспортиран през помпата.

1.6.9. Температурен контрол

Температурата на критичните вътрешни компоненти (инжекторна верига, колони, детектор и тръбна инсталация) трябва да бъде постоянна и съвместима с избора на разтворител.

▼ B**1.6.10. Детектор**

Предназначението на детектора е да отчита количествено концентрацията на пробата, елуирала от колоната. С цел да се избегне ненужното разширяване на пиковите, обемът на кюветката на детекторната клетка трябва да се поддържа възможно най-малък. Той не трябва да бъде по-голям от 10 μ l, освен при разсейване и детектори за вискозитет. За детекция обикновено се използва диференциална рефрактометрия. Въпреки това, ако специфичните свойства на пробата или на елуиращия разтвор го изискват, може да се използват други видове детектори, например UV/VIS, IR, детектори за вискозитет и т.н.

2. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ**2.1. Данни**

Подробните оценъчни критерии, както и изискванията относно събирането и обработката на данни, са посочени в DIN стандарт (1).

За всяка проба трябва да се извършат два независими опита. Те се анализират индивидуално.

При всяко измерване се обезпечават M_n , M_w , M_w/M_n и M_p . Необходимо е изрично да се посочи, че измерените стойности са относителни стойности, еквивалентни на молекулните тегла на използвания стандарт.

След определяне на обемите на задържане или времената на задържане (които може да са коригирани чрез вътрешен стандарт), регистрираните M_p стойности (M_p като максимален пик на калибрационния стандарт) се изчертават спрямо едно от тези количества. Необходими са поне две калибрационни точки за десет молекулни тегла и поне пет измервателни точки за цялата крива, които трябва да покриват очакваното молекулно тегло на пробата. Прекъсващата точка с нискомолекулно тегло на калибрационната крива се определя от n-хексилбензола или друг подходящ неполярен разтворител. Бройните и тегловните средни молекулни тегла обикновено се определят с помощта на електронна обработка на данните, на базата на формулите в точка 1.2. В случай че се използва ръчна цифровизация на данните, може да се обърнете към ASTM D 3536-91 (3).

Кривата на разпределението трябва да се направи под формата на таблица или като диаграма (диференциална честота или сума на процентите спрямо отчетените M). При графичното представяне една декада от молекулни тегла трябва да има около 4 cm широчина и максималният пик да има около 8 cm височина. При интегрални криви на разпределение разликата в ординатата между 0 и 100 % трябва да бъде около 10 cm.

2.2. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването трябва да включва следна информация:

2.2.1. Изпитвано вещество

— налична информация за изпитваното вещество (идентичност, добавки, примеси),

▼B

- описания на обработката на пробата, наблюдения, проблеми.

2.2.2. Оборудване

- резервоар за елуент, инертен газ, дегазиране на елуента, състав на елуента, примеси,
- помпа, гасител на пулсации, инжекторна система,
- сепарационни колони (производител, пълна информация за характеристиките на колоните, като размер на порите, вид на сепарационния материал, брой, дължина и ред на използваните колони),
- брой на теоретичните пластини на колоната (или комбинацията от колони), сепарационна производителност (резолюция на системата),
- информация за симетрията на пиковете,
- температура на колоната, вид на температурния контрол,
- детектор (принцип на измерване, тип, обем на кюветката),
- разходомер, ако се използва (производител, принцип на измерване),
- система за записване и обработка на данните (хардуер и софтуер).

2.2.3. Калибровка на системата

- подробно описание на метода, използван за построяване на калибрационната крива,
- информация за критериите за качество при този метод (например корелационен коефициент, квадратична сума на грешките и т.н.),
- информация за всички екстраполации, допускания и приближения, направени по време на експерименталната процедура, а също и за оценката и обработката на данните,
- всички измервания, използвани за построяване на калибрационната крива, трябва да са документирани в таблица, която включва следната информация за всяка калибрационна точка:
 - име на пробата,
 - производител на пробата,
 - характерни стойности на стандартите M_p , M_n , M_w и M_w/M_n , дадени от производителя или получени при последващи измервания, заедно с подробностите за метода на определяне,
 - инжекторен обем или инжекторна концентрация,

▼B

- стойност на M_p , използвана за калибровка,
- елуиращ обем или коригирано време на задържане, измерено в максималния пик,
- M_p , изчислено при максималния пик,
- процентна грешка на изчисленото M_p и калибрационната стойност.

2.2.4. Оценка

- оценка на база време: методи, използвани за обезпечаване на необходимата възпроизводимост (метод на корекция, вътрешен стандарт и т.н.),
- информация дали оценката е била извършена на базата на елуиращия обем или на базата на времето на задържане,
- информация за лимитите на оценката, ако пикът не е напълно анализиран,
- описание на методите за изглаждане, ако са използвани такива,
- подготовка и предварителни процедури преди обработката на пробата,
- наличие на неразтворени частици, ако има,
- инжекторен обем (μl) и инжекторна концентрация (mg/ml),
- наблюдения, посочващи ефекти, които водят до отклонения от идеалния GPC профил,
- подробно описание на всички модификации в изпитвателните процедури,
- подробности за диапазоните на грешките,
- всякаква друга информация и наблюдения, подходящи за интерпретация на резултатите.

3. ПРЕПРАТКИ

- (1) DIN 55672, 1995. Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.
- (2) Yau, W. W., Kirkland, J. J., and Bly, D. D. eds, 1979. Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.
- (3) ASTM D 3536-91, 1991. Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography – GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (4) ASTM D 5296-92, 1992. Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.



Допълнение

Примери за други методи за определяне на средното бройно молекулно тегло (M_n) за полимери

Хроматографският метод с гел инфилтрация (GPC) е предпочитаният метод за определяне на M_n , особено когато има набор от стандарти, чиято структура е сравнима с полимерната структура. Независимо от това, било поради практически трудности при използването на GPC, или поради очакването, че веществото няма да отговори на задължителните критерии за M_n (което води до потвърждаване), се срещат алтернативни методи, като например:

1. Употреба на колигативни свойства

1.1. Ебулиоскопия/криоскопия:

включва измерване на повишаването на точката на кипене (ебулиоскопия) или понижаването на точката на замръзване (криоскопия) на разтворител при прибавяне на полимер. Този метод се базира на факта, че ефектът от разтворения полимер върху точката на кипене/замръзване на течността зависи от молекулното тегло на полимера (1) (2).

Приложимост: $M_n < 20\,000$.

1.2. Понижаване на парното налягане:

включва измерване на парното налягане на избрана еталонна течност преди и след прибавянето на определени количества полимер (1) (2).

Приложимост: $M_n < 20\,000$ (теоретично; на практика обаче е лимитирана стойност).

1.3. Мембранна осмометрия:

основава се на принципа на осмозата, т.е. естествената тенденция на молекулите на разтворителя да преминават през полупропускливата мембрана от разреден към концентриран разтвор, за да се получи равновесие. При изпитването разределеният разтвор е с нулева концентрация, докато концентрираният разтвор съдържа полимера. Ефектът на преминаване на разтворителя през мембраната причинява разлика в налягането, която зависи от концентрацията и молекулното тегло на полимера (1) (3) (4).

Приложимост: M_n между 20 000 и 200 000.

1.4. Осмометрия в нарова фаза:

включва сравнение на скоростта на изпаряване на чист аерозолен разтворител спрямо поне три аерозола, съдържащи полимера в различни концентрации (1) (5) (6).

Приложимост: $M_n < 20\,000$.

▼B**2. Анализ на групата, прекъсваща нарастването на веригата**

За да се използва този метод, са необходими както познания за общата структура на полимерите, така и за естеството на групите, прекъсващи нарастването на веригата (която трябва да се разграничава от основния скелет например по NMR или титруване/дериватизация). Определянето на молекулната концентрация на прекъсващите групи, присъстващи в полимера, може да доведе до стойност за молекулното тегло (7) (8) (9).

Приложимост: M_n до 50 000 (с намаляваща надеждност).

3. Препратки

- (1) Billmeyer, F. W. Jr., 1984. Textbook of Polymer Science, 3rd Ed., John Wiley, New York.
- (2) Glover, C. A., 1975. Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I, P. E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.
- (3) ASTM D 3750-79, 1979. Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (4) Coll, H., 1989. Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A. R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25 to 52.
- (5) ASTM 3592-77, 1977. Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (6) Morris, C. E. M., 1989. Vapour Pressure Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A. R. Cooper ed., John Wiley and Sons.
- (7) Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., 1989. Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.
- (8) Garmon, R. G., 1975. End-Group Determinations, Chapter 3. In: Polymer Molecular Weights, Part I, P. E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.
- (9) Amiya, S., et al., 1990. Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B**A.19. НИСКОМОЛЕКУЛНО ТЕГЛОВНО СЪДЪРЖАНИЕ НА ПОЛИМЕРИ****1. МЕТОД**

Този хроматографски метод с гел инфилтрация е точно копие на метода ОИСП TG 119 (1996 г.). Основните принципи и по-подробна техническа информация са дадени в препратките.

1.1. УВОД

Тъй като свойствата на полимерите са много разнообразни, не е възможно да се опише един-единствен метод, установяващ точно условията за сепарация и оценка, който да обхваща възможностите и спецификата, които се получават при сепарацията на полимерите. По-специално сложните полимерни системи често не се поддават на хроматография с гел инфилтрация (GPC). Когато GPC е неприложима, молекулното тегло се определя с помощта на други методи (вж. допълнението). В такива случаи пълните подробности и оценката се правят на базата на използвания метод.

Описаният метод се базира на DIN стандарта 55672 (1). В този DIN стандарт може да се намери подробна информация как да се извършат изпитванията и как да се оценят данните. В случай че са необходими модификации на условията на изпитване, тези промени трябва да бъдат оправдани. Могат да се използват и други стандарти, ако са напълно подходящи. Описаният метод използва проби от полистирол с позната полидисперсност за калибровка и може да се наложи да бъде променен, с цел да бъде подходящ за определени полимери, например водоразтворими полимери и полимери с дълги разклонени вериги.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Нискомолекулното тегло условно се определя като молекулно тегло под 1 000 далтона.

Средното бройно молекулно тегло M_n и средното тегловно молекулно тегло M_w се определят с помощта на следните уравнения:

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

където:

H_i = нивото на детекторния сигнал от базовата линия на обема на задържане V_i ,

M_i = молекулното тегло на полимерната фракция при обема на задържане V_i , и n броя на точките с данни.

Широчината на разпределение на молекулното тегло, която е мярка за дисперсността на системата, се изразява чрез съотношението M_w/M_n .

▼ B

1.3. ЕТАЛОННИ ВЕЩЕСТВА

Тъй като GPC е относителен метод, трябва да се извърши калибровка. За целта обикновено се използват полистиролови стандарти с линеен строеж и тясно разпределение, с познати средни молекулни тегла M_n и M_w и познато молекулно теглово разпределение. Калибрационната крива може да се използва само при определяне на молекулното тегло на непозната проба, ако условията за разделяне на пробата и стандартите са били подбрани по идентичен способ.

Една установена връзка между молекулното тегло и елуирания обем е валидна само при специфичните условия на даденото изпитване. Условията включват преди всичко температурата, разтворителя (или сместа от разтворители), хроматографските условия и сепарационната колона или система от колони.

Молекулните тегла на пробата, определени по този начин, са относителни стойности и се описват като „полистиролови еквивалентни молекулни тегла“. Това означава, че в зависимост от структурните и химическите различия между пробата и стандартите, молекулните тегла могат да се отклоняват от абсолютните стойности в по-голяма или по-малка степен. Ако се използват други стандарти, например полиетиленгликол, полиетиленов окис, полиметил метакрилат, полиакрилна киселина, трябва да се посочи причината за това.

1.4. ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАТЕЛНИЯ МЕТОД

Както разпределението на молекулното тегло на пробата, така и нейните средни молекулни тегла (M_n , M_w) могат да се определят чрез GPC. GPC е специален тип течна хроматография, при която пробата се сепарира според хидродинамичните обеми на отделните съставни части (2).

Сепарацията се извършва, като пробата преминава през колона, която е пълна с порест материал, обикновено органичен гел. Малките молекули могат да проникват през порите, докато големите молекули не могат. Следователно пътят на по-големите молекули е по-къс и те елуират първи. Молекулите със среден размер проникват през някои от порите и елуират по-късно. Най-малките молекули, със среден хидродинамичен радиус, по-малък от този на порите на гела, могат да проникват през всички пори. Те елуират последни.

В идеалния случай сепарацията се контролира изцяло от размера на молекулните видове, но на практика е трудно да се избегнат поне някои от абсорбиционните ефекти, които смущават процеса. Неравномерната облицовка на колоната и мъртвите обеми могат да влошат ситуацията (2).

Детекцията се извършва например чрез рефрактивен индекс или UV-абсорбция и се получава проста крива на разпределението. За да се прибавят обаче действителните стойности на молекулните тегла към кривата, е необходимо да се калибрира колоната, като през нея се пуснат полимери с известно молекулно тегло и в идеалния случай с доста широка подобна структура, например различни полистиролови стандарти. Резултатът е типична крива на Gaussian, на места изкривена от малка опашка по посока на страната с ниско молекулно тегло, като вертикалната ос показва количеството по тегло на различните елуирани видове молекулни тегла, а хоризонталната ос показва регистрираното молекулно тегло.

▼B

Съдържанието на нискомолекулно тегло се получава от тази крива. Изчислението може да бъде точно само ако нискомолекулярните видове реагират еквивалентно на база маса спрямо полимера като цяло.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Повторяемостта (относителното стандартно отклонение — Relative Standard Deviation (RSD) на елуиращия обем трябва да бъде по-добра от 0,3 %. Желаната повторяемост на анализа трябва да се гарантира чрез корекция през вътрешен стандарт, ако хроматограмата се оценява в зависимост от времето и не отговаря на горепосочените критерии (1). Полидисперсностите зависят от молекулните тегла на стандартите. В случая с полистироловите еталони типичните стойности са:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1,20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1,05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1,20$

(M_p е молекулното тегло на еталона при максималния пик)

1.6. ОПИСАНИЕ НА ИЗПИТВАТЕЛНИЯ МЕТОД

1.6.1. Подготовка на стандартните полистиролови разтвори

Полистироловите стандарти се разтварят чрез внимателно смесване в избрания елуент. При подготовката на разтворите трябва да се вземат предвид препоръките на производителя.

Концентрациите на избраните стандарти зависят от различни фактори, например обем на инжектиране, вискозитет на разтвора и чувствителност на аналитичния детектор. Максималният обем на инжектиране трябва да се адаптира към дължината на колоната, с цел да се избегне претоварване. Типичните обеми на инжектиране за аналитична сепарация чрез GPC с колона 30 cm x 7,8 mm, са обикновено между 40 и 100 μ l. Възможни са и по-големи обеми, но те не трябва да превишават 250 μ l. Оптималното съотношение между обема на инжектиране и концентрацията трябва да се определи преди действителната калибровка на колоната.

1.6.2. Подготовка на разтвора проба

Принципно при подготовката на разтворите проби се прилагат същите изисквания. Мострата се разтваря в подходящ разтворител, например тетраhydroфуран (THF), чрез старателно разклащане. Тя не трябва при никакви обстоятелства да се разтваря с помощта на ултразвукова баня. Когато е необходимо, разтворът проба се пречиства през мембранен филтър с размер на порите между 0,2 и 2 μ m.

Присъствието на неразтворени частици трябва да се отчете във финалния протокол, тъй като тези частици може да се дължат на високомолекулярни видове. Трябва да се използва подходящ метод за определяне процента на теглото на разтворените частици. Разтворите трябва да се използват в рамките на 24 часа.

▼ B**1.6.3. Корекция на съдържанието на примеси и добавки**

Обикновено не се налага корекцията на съдържанието на видове с $M < 1\,000$ поради приноса от присъстващите неполимерни специфични компоненти (например примеси и/или добавки), освен ако измереното съдържание вече е $< 1\%$. Това се постига чрез пряк анализ за полимерния разтвор или GPC елуат.

В случаите, когато елуатът, след преминаване през колоната, е твърде разреден за по-нататъшен анализ, той трябва да се концентрира. За целта може би ще е необходимо да се изпари елуатът до изсушаване и да се разтвори отново. Концентрацията на елуата трябва да се извърши при условия, които да не допускат никакви промени в елуата. Обработката на елуата след GPC зависи от използвания аналитичен метод за количествено определяне.

1.6.4. Апаратура

GPC-апаратурата се състои от следните компоненти:

- резервоар за разтворител,
- дегазатор (ако е необходимо),
- помпа,
- гасител на пулсации (ако е необходимо),
- инжекторна система,
- хроматографски колони,
- детектор,
- разходомер за дебит (ако е необходимо),
- процесор-рекордер за данни,
- съд за отпадъци.

Трябва да се гарантира, че GPC системата е инертна по отношение на използваните разтворители (например, чрез използване на стоманени капилари за THF-разтворителя).

1.6.5. Система за инжектиране и подаване на разтворител

Към колоната се подава определен обем разтвор на пробата или автоматично, или ръчно в строго определена зона. Твърде бързото издърпване или натискане на буталото на помпата, ако се прави ръчно, може да причини промени в наблюдаваното разпределение на молекулното тегло. Системата за подаване на разтворител трябва, доколкото е възможно, да няма пулсации, включвайки гасител на пулсации в идеалния случай. Дебитът е от порядъка на 1 ml/min.

1.6.6. Колона

В зависимост от пробата полимерът може да се охарактеризира или с помощта на проста колона, или чрез няколко колони, свързани последователно. На пазара се предлагат порести материали за колони с определени свойства (например размер на порите, лимити на изключване). Изборът на сепарационен гел или на дължина на колоната зависи както от свойствата на пробата (хидродинамични обеми, разпределение на молекулното тегло), така и от специфичните условия за сепарация, като разтворител, температура и дебит (1) (2) (3).

▼ В**1.6.7. Теоретични пластини**

Колоната или комбинацията от колони, използвана(и) за сепарация, трябва да се охарактеризира(т) чрез броя на теоретичните пластини. Това включва, в случая на THF като елуиращ разтворител, подаване на разтвор на етилбензол или друг подходящ неполярен разтвор към колона с известна дължина. Броят на теоретичните пластини се определя чрез следното уравнение:

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

където:

N = броя на теоретичните пластини

V_e = елуирация обем при максималния пик

W = пика на широчината на базовата линия

$W_{1/2}$ = е пиковата широчина при половин височина

1.6.8. Сепарационна производителност

Освен броя на теоретичните пластини, който е количество, определящо широчината на зоната, известна роля играе и сепарационната производителност, която се определя от стръмността на калибрационната крива. Сепарационната производителност на една колона се получава от следната зависимост:

$$\frac{V_{eyM_x} - V_{ey(10M_x)}}{\text{площма на напречно сечение на колоната}} \geq 6,0 \left[\frac{\text{cm}^2}{\text{cm}^3} \right]$$

V_{eyM_x} = елуирация обем за полистирол с молекулно тегло M_x

$V_{ey(10M_x)}$ = елуирация обем за полистирол с 10 пъти по-голямо молекулно тегло.

Резолюцията на системата обикновено се определя, както следва:

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

където,

V_{e1}, V_{e2} = елуиращите обеми на двата полистиролови стандарта в максималния пик

W_1, W_2 = пиковите широчини в базовата линия

M_1, M_2 = молекулните тегла в максималния пик (трябва да се различават с коефициент 10).

R-стойността на системата колони трябва да бъде по-голяма от 1,7 (4).

▼ B**1.6.9. Разтворители**

Всички разтворители трябва да бъдат с висока чистота (за THF се използва чистота 99,5 %). Резервоарът за разтворител (ако е необходимо в атмосфера от инертен газ) трябва да е достатъчно голям за калибровката на колоната и няколко анализа на проби. Разтворителят трябва да се дегазира, преди да бъде транспортиран през помпата.

1.6.10. Температурен контрол

Температурата на критичните вътрешни компоненти (инжекторна верига, колони, детектор и тръбна инсталация) трябва да бъде постоянна и съвместима с избора на разтворител.

1.6.11. Детектор

Предназначението на детектора е да отчита количествено концентрацията на пробата, елуирала от колоната. С цел да се избегне ненужното разширяване на пиковите, обемът на кюветката на детекторната клетка трябва да се поддържа възможно най-малък. Той не трябва да бъде по-голям от 10 μ l, освен при разсейване и детектори за вискозитет. За детекция обикновено се използва диференциална рефрактометрия. Въпреки това, ако специфичните свойства на пробата или на елуирация разтвор го изискват, може да се използват други видове детектори, например UV/VIS, IR, детектори за вискозитет и т.н.

2. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ**2.1. ДАННИ**

Подробните оценъчни критерии, както и изискванията относно събирането и обработката на данни, са посочени в DIN стандарт (1).

За всяка проба трябва да се извършат два независими опита. Те се анализират индивидуално. При всички случаи е важно да се определят също данните от контролните опити, обработени при същите условия както пробата.

Необходимо е изрично да се посочи, че измерените стойности са относителни стойности, еквивалентни на молекулните тегла на използвания стандарт.

След определяне на обемите на задържане или времената на задържане (които може да са коригирани чрез вътрешен стандарт), регистрираните M_p стойности (M_p като максимален пик на калибрационния стандарт) се изчертават спрямо едно от тези количества. Необходими са поне две калибрационни точки за една декада молекулни тегла и поне пет измервателни точки за цялата крива, които трябва да покриват очакваното молекулно тегло на пробата. Прекъсващата точка с нискомолекулно тегло на калибрационната крива се определя от n-хексилбензола или друг подходящ неполярен разтворител. Частта от кривата, съответстваща на молекулни тегла под 1 000, се определя и коригира, както е необходимо за примеси и добавки. Елуиращите криви обикновено се оценяват чрез електронна обработка на данните. В случай че се използва ръчна цифровизация на данните, може да направите справка в ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Ако в колоната се задържи някакъв неразтворим полимер, неговото молекулно тегло вероятно ще бъде по-високо от това на разтворимата фракция и ако не се отчете, ще резултира в надценяване на съдържанието на нискомолекулно тегло. В допълнението е дадено ръководство за съдържание на нискомолекулно тегло за неразтворим полимер.

Кривата на разпределението трябва да се направи под формата на таблица или като диаграма (диференциална честота или сума на процентите спрямо отчетените M). При графичното представяне една декада от молекулни тегла трябва да има около 4 cm широчина и максималният пик да има около 8 cm височина. При интегралните криви на разпределение разликата в ординатата между 0 и 100 % трябва да бъде около 10 cm.

2.2. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването трябва да включва следна информация:

2.2.1. Изпитвано вещество

- налична информация за изпитваното вещество (идентичност, добавки, примеси),
- описания на обработката на пробата, наблюдения, проблеми.

2.2.2. Оборудване

- резервоар за елуент, инертен газ, дегазиране на елуента, състав на елуента, примеси,
- помпа, гасител на пулсации, инжекторна система,
- сепарационни колони (производител, пълна информация за характеристиките на колоните, като размер на порите, вид на сепарационния материал, брой, дължина и ред на използваните колони),
- брой на теоретичните пластини на колоната (или комбинацията от колони), сепарационна производителност (резолюция на системата),
- информация за симетрията на пиковете,
- температура на колоната, вид на температурния контрол,
- детектор (принцип на измерване, тип, обем на кюветката),
- разходомер, ако се използва (производител, принцип на измерване),
- система за записване и обработка на данните (хардуер и софтуер).

2.2.3. Калибровка на системата

- подробно описание на метода, използван за построяване на калибрационната крива,

▼ B

- информация за критериите за качество при този метод (например корелационен коефициент, квадратична сума на грешките и т.н.),
- информация за всички екстраполации, допускания и приближения, направени по време на изпитвателната процедура, а също и за оценката и обработката на данните,
- всички измервания, използвани за построяване на калибрационната крива, трябва да са документирани в таблица, която включва следната информация за всяка калибрационна точка:
 - име на пробата,
 - производител на пробата,
 - характерни стойности на стандартите M_p , M_n , M_w и M_w/M_n , дадени от производителя или получени при последващи измервания, заедно с подробностите за метода на определяне,
 - инжекторен обем или инжекторна концентрация,
 - стойност на M_p , използвана за калибровка,
 - елуиращ обем или коригирано време на задържане, измерено в максималния пик,
 - M_p , изчислено при максималния пик,
 - процентна грешка на изчисленото M_p и калибрационната стойност.

2.2.4. Информация за съдържанието на полимер с нискомолекулно тегло

- описание на методите, използвани в анализа, и начина, по който са проведени изпитванията,
- информация за процента на съдържанието на видове полимери с нискомолекулно тегло (т/т), отнесен към общата проба,
- информация за примесите, добавките и други неполимерни видове, в тегловен процент, отнесен към общата проба.

2.2.5. Оценка

- оценка на база време: всички методи, използвани за обезпечаване на необходимата възпроизводимост (метод на корекция, вътрешен стандарт и т.н.),
- информация дали оценката е била извършена на базата на елуиращия обем, или на базата на времето на задържане,
- информация за лимитите на оценката, ако пикът не е напълно анализиран,
- описание на методите за изглаждане, ако са използвани такива,
- подготовка и предварителни процедури преди обработката на пробата,
- наличие на неразтворени частици, ако има,

▼B

- инжекторен обем (μl) и инжекторна концентрация (mg/ml),
- наблюдения, посочващи ефекти, които водят до отклонения от идеалния GPC-профил,
- подробно описание на всички модификации в изпитвателните процедури,
- подробности за диапазоните на грешките,
- всякаква друга информация и наблюдения, подходящи за интерпретация на резултатите.

3. ПРЕПРАТКИ

- (1) DIN 55672, 1995. Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.
- (2) Yau, W. W., Kirkland, J. J., and Bly, D. D. eds., 1979. Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.
- (3) ASTM D 3536-91, 1991. Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography — GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (4) ASTM D 5296-92, 1992. Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.



Допълнение

Ръководство за коригиране на нискомолекулното съдържание за присъствието на неразтворим полимер

Когато в една проба присъства неразтворим полимер, това резултира в загуба на маса по време на GPC-анализа. Неразтворимият полимер необратимо се задържа върху колоната или филтъра за пробата, докато разтворимата част преминава през колоната. В случая, когато може да се изчисли или измери нарастването (dn/dc) на рефрактивния индекс на полимера, е възможно да се изчисли и загубата на маса на пробата в колоната. В този случай се прави корекция с помощта на външна калибровка със стандартни материали с познати концентрация и dn/dc , за да се калибрира реакцията на рефрактометъра. В дадения тук пример е използван поли(метилметакрилат) (pMMA) стандарт.

При външна калибровка за анализ на акрилни полимери един pMMA стандарт с позната концентрация в тетраhydroфуран се анализира чрез GPC и получените данни се използват за намиране на константата на рефрактометъра съгласно уравнението:

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

където:

K = рефрактометричната константа (в $\mu V/s/ml$)

R = реакцията на pMMA стандарта (в $\mu V/s$)

C = концентрацията на pMMA стандарта (в mg/ml)

V = инжекторния обем (в ml), и

dn/dc = нарастването на рефрактивния индекс за pMMA в тетраhydroфуран (в ml/mg).

Следните данни са типични за един pMMA стандарт:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^5 ml/mg

Резултантната стойност K, $3,05 \times 10^{11}$, се използва за изчисляване на теоретичната детекторна реакция, ако 100 % от инжектирания полимер е елуиран през детектора.

▼B**A.20. ПОВЕДЕНИЕ НА РАЗТВАРЯНЕ/ЕКСТРАКЦИЯ НА ПОЛИМЕРИ ВЪВ ВОДА****1. МЕТОД**

Описаният метод е точно копие на преработената версия на ОИСР TG 120 (1997 г.). По-подробна техническа информация е дадена в препратка (1).

1.1. УВОД

За някои полимери, като емулсионните полимери например, вероятно ще бъде необходима първоначална подготвителна работа, преди да се използва описаният по-долу метод. Този метод не е приложим за течни полимери и за полимери, които взаимодействат с вода при условията на изпитването.

Когато методът не е практичен или възможен, поведението на разтваряне/екстракция може да се изследва чрез други методи. В такива случаи трябва да се дадат пълни подробности и причини за използвания метод.

1.2. ЕТАЛОННИ ВЕЩЕСТВА

Няма.

1.3. ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАТЕЛНИЯ МЕТОД

Поведението на разтваряне/екстракция на полимерите във водна среда се определя с помощта на метода на стъклената (вижте А.6 Разтворимост във вода, метод на стъклената) с модификациите, описани по-долу.

1.4. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.5. ОПИСАНИЕ НА ИЗПИТВАТЕЛНИЯ МЕТОД**1.5.1. Оборудване**

За метода се изисква следното оборудване:

- устройство за надробвяване, например мелница за производство на частици с определен размер,
- апаратура за разбъркване с възможност за температурен контрол,
- мембранна филтърна система,
- подходящо аналитично оборудване,
- стандартизирани сита.

1.5.2. Подготовка на пробата

Представителната проба първо се довежда до размер на частиците между 0,125 и 0,25 mm с помощта на подходящи сита. Може да е необходимо да се извърши охлаждане за устойчивостта на пробата или за процеса на смилане. Материалите с каучуково естество се раздробяват при температурата на течния азот (1).

Ако не се получи фракция с желания размер на частиците, трябва да се предприемат действия за намаляване на размера на частиците доколкото е възможно и резултатът да се отчете. В протокола е необходимо да се посочи начинът, по който раздробената проба е съхранявана преди изпитването.

▼B**1.5.3. Процедура**

Три проби по 10 g от изпитваното вещество се претеглят във всеки един от трите съда, снабдени със стъклени запушалки, и към всеки съд се добавят по 1 000 ml вода. Ако се докаже, че количеството от 10 g е непригодно, се използва следващото най-голямо количество и обемът вода се напасва съответно.

Съдовете се запушват плътно и след това се разбъркват при 20 °C. За целта се използва прибор за разбъркване или разклащане, който да работи при постоянна температура. След период от 24 часа съдържанието на всеки съд се центрофугира или филтрира и концентрацията на полимера в бистрата водна фаза се определя чрез подходящ аналитичен метод. Ако няма подходящи аналитични методи за водната фаза, общата разтворимост/екстракция може да се изчисли от сухото тегло на филтърния остатък или центрофугираната утайка.

Обикновено е необходимо да се разграничат количествено примесите и добавките, от една страна, и нискомолекулните видове, от друга. При гравиметричното определяне е важно също да се извърши контролно (празно) изпитване без изпитвано вещество, за да се отчетат остатъците, които се появяват при процедурата на изпитването.

Поведението на разтворимост/екстракция на полимерите във вода при 37 °C и рН 2 и рН 9 се определя по същия начин, както описания по-горе за провеждането на изпитването при 20 °C. Стойностите за рН могат да се постигнат чрез добавяне или на подходящи буферни разтвори, или на подходящи киселини или основи, като солна киселина, оцетна киселина, аналитичен натриев или калиев хидроокис или NH₃.

В зависимост от използвания метод за анализ трябва да се извършат едно или две изпитвания. Когато са налице достатъчно специфични методи за директен анализ на водната фаза за полимерния компонент, едно изпитване като описаното по-горе би било достатъчно. Ако обаче не са налице такива методи и определянето на поведението на разтворимост/екстракция на полимера се ограничава до индиректен анализ чрез определяне само на общото съдържание на въглерод (ТОС) на водния екстракт, трябва да бъде проведено допълнително изпитване. Това допълнително изпитване също трябва да бъде извършено три пъти, като се използват 10 пъти по-малки проби от полимера и същите количества вода, като тези, използвани в първото изпитване.

1.5.4. Анализ**1.5.4.1. Изпитване, проведено с един обем проба**

Съществуват методи за директен анализ на полимерните компоненти във водната фаза. Алтернативно може да се използва и индиректният анализ на разтворени/екстрахирани полимерни компоненти чрез определяне на общото съдържание на разтворими части и коригиране за неполимерни специфични компоненти във водната фаза.

Възможно е да се извърши анализ на водната фаза за общите полимерни видове:

или чрез достатъчно чувствителен метод, например:

— ТОС, използващ изваряване на персулфат или дихромат, за да се получи CO₂, последван от изчисление чрез IR или химичен анализ,

▼B

— атомна абсорбционна спектрометрия (AAS) или нейния индуктивно куплиран плазмен (ICP) емисионен еквивалент за силиций или полимери, съдържащи метали,

— UV-абсорбция или спектрофлуорометрия за арилни полимери,

— LC-MS за нискомолекулни проби,

или чрез вакуумно изпарение до изсушаване на водния екстракт и спектроскопен (IR, UV и т.н.) или AAS/ICP анализ на остатъка.

Ако анализът на водната фаза като такъв не е приложим, водният екстракт трябва да се екстрахира с органичен разтворител, който не се смесва с вода, например хлориран въглеродород. Разтворителят се изпарява и остатъкът се анализира, както е описано по-горе, за оповестеното съдържание на полимера. Всички компоненти в този остатък, идентифицирани като примеси или добавки, трябва да се извадят за целите на определянето на степента на разтворимост/екстракция на самия полимер.

Когато присъстват относително големи количества от такива материали, може би ще е необходимо да се направи анализ на остатъка, например HPLC или GC анализ, за да се разграничат примесите от мономера и присъстващите видове, получени от мономера, така че да бъде определено истинското съдържание на последния.

В някои случаи може да е достатъчно просто изпаряване на органичния разтворител до изсушаване и претегляне на сухия остатък.

1.5.4.2. *Изпитване, проведено с два различни обема проба*

Всички водни екстракти се анализират за ТОС.

Извършва се гравиметрично определяне на неразтворената/неекстрахираната част на пробата. Ако след центрофугирането или филтрирането на съдържанието на всеки съд полимерните остатъци останат залепнали към стената на съда, съдът трябва да се изплаква с филтратата, докато се изчисти от всички видими остатъци. След това филтратът отново се центрофугира или филтрира. Остатъците, останали върху филтъра или в центрофугиращата тръба, се изсушават при 40 °C във вакуум и се претеглят. Сушенето продължава, докато се достигне постоянно тегло.

2. ДАНИИ

2.1. ИЗПИТВАНЕ, ПРОВЕДЕНО С ЕДИН ОБЕМ ПРОБА

Индивидуалните резултати за всяка от трите колби и средните стойности се посочват и изразяват в единици за маса/обем на разтвора (обикновено mg/l) или за маса на полимера (обикновено mg/g). Освен това се посочва загубата на тегло на пробата (изчислена като тегло на разтвора, разделено на началното тегло на пробата). Трябва да се изчислят и относителните стандартни отклонения (RSD). Посочват се индивидуалните цифри за общото количество вещество (полимер + съществени добавки и т.н.) и само за полимера (т.е. след изваждане на участието от такива добавки).

▼B**2.2. ИЗПИТВАНЕ, ПРОВЕДЕНО С ДВА РАЗЛИЧНИ ОБЕМА ПРОБА**

Индивидуалните ТОС-стойности на водните екстракти на две тройни изпитвания и средната стойност за всяко изпитване се посочват като единици за маса/обем на разтвора (обикновено mgC/l), както и като единици за маса/тегло на първоначалната проба (обикновено mgC/g).

Ако няма разлика между резултатите при най-високото и най-ниското съотношение проба/вода, това може да означава, че всички екстрахируеми компоненти наистина са били екстрахираны. В такъв случай обикновено не е необходим директен анализ.

Индивидуалните тегла на остатъците се посочват и изразяват в процент от началните тегла на пробите. Средните стойности се изчисляват за всяко изпитване. Разликите между 100 и процентите, които се получават, представляват процента на разтворения и екстрахиран материал в първоначалната проба.

3. ОТЧИТАНЕ**3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Протоколът от изпитването трябва да включва следна информация:

3.1.1. Изпитвано вещество

— налична информация за изпитваното вещество (идентичност, добавки, примеси, съдържание на нискомолекулни видове).

3.1.2. Условия на изпитването

— описание на използваните процедури и условията на изпитването,
— описание на аналитичните методи и методите за детекция.

3.1.3. Резултати

— резултати за разтворимост/екстрахируемост в mg/l; индивидуални усреднени стойности за изпитването на екстракция при различните разтвори, с разбивка за съдържание на полимер и примеси, добавки и т.н.,
— резултати за разтворимост/екстрахируемост в mg/g на полимера,
— ТОС-стойности на водни екстракти, тегло на разтвора и изчислените проценти, ако са измерени,
— рН на всяка проба,
— информация за контролните стойности,
— когато е необходимо, указания за химичната неустойчивост на изпитваното вещество, както по време на процеса на изпитване, така и по време на аналитичния процес,
— цялата информация, която е важна за интерпретацията на резултатите.

4. ПРЕПАТКИ

DIN 53733, 1976. Zerkleinerung von Kunststoffzeugnissen für Prüfzwecke.



A.21. ОКСИДИРАЩИ СВОЙСТВА (ТЕЧНОСТИ)

1. МЕТОД

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Този метод за изпитване е предназначен за измерване на потенциала на вещество в течно състояние да повишава степента си на изгаряне или на интензивността на изгаряне на запалимите вещества, или да образува смес със запалимо вещество, която може спонтанно да се възпламени при пълно смесване на двете вещества. Той се основава на метода на ООН за оксидиращи течности (1) и е еквивалентен на него. Въпреки това, тъй като методът A.21 е предназначен преди всичко да отговори на изискванията на Регламент (ЕО) № 1907/2006, се изисква да се направи сравнение само с едно вещество за сравнение. Може да се наложи провеждането на допълнителни изпитвания и сравнения с други вещества за сравнение, когато се очаква резултатите от изпитването да бъдат използвани за други цели (1).

Този метод не може да бъде използван, когато изследването на структурната формула установи по безспорен начин, че веществото не може да реагира екзотермично със запалим материал.

Полезно е, преди провеждане на изпитването, да има предварителна информация за евентуалните експлозивни свойства на веществото.

Този метод не може да бъде приложен за твърди вещества, газове, експлозивни или силнозапалими вещества, или органични пероксиди.

Провеждането на това изпитване не е необходимо, когато вече има резултати за изпитването вещество по метода на ООН за оксидиращи течности (1).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Средно време за повишаване на налягането е средноаритметичната стойност от измерените времена, за които изпитваната смес предизвиква повишаване на налягането от 690 kPa до 2 070 kPa над атмосферното налягане.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Като вещество за сравнение (2) се използва воден разтвор 65 тегл. % на азотната киселина (х.ч.а).

(1) Както например в рамките на правилата на ООН, свързани с транспорта.

(2) Киселината следва да се титрува преди изпитването, за да се установи нейната концентрация.

▼B

В случаите, когато лицето, провеждащо изпитването, предполага, че резултатите от това изпитване може да бъдат използвани за други цели ⁽¹⁾, може също да се проведе едно изпитване с други допълнителни вещества за сравнение ⁽²⁾.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Течността, която ще бъде изпитвана, се смесва в тегловно съотношение 1:1 с фиброзна целулоза и се вкарва в съд под налягане. Ако по време на смесването или при въвеждането ѝ в реактора възникне спонтанно запалване, не е необходимо по-нататъшно изпитване.

Ако по време на провеждане на изпитването не възникне спонтанно запалване, сместа се нагрява в съда под налягане, докато налягането не нарасне от 690 kPa до 2 070 kPa над атмосферното налягане, и се отчита средното време за повишаване на налягането. То се сравнява със средното време за повишаване на налягането на смес в съотношение 1:1 на веществото(ата) за сравнение и целулозата.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

В серии от по пет опита за едно вещество следва резултатите да не се различават с повече от 30 % от средноаритметичната стойност. Резултатите, които се различават с повече от 30 % от стойността, се пренебрегват, процедурите по смесване и напъване се оптимизират и изпитването се повтаря.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ**1.6.1. Подготовка****1.6.1.1. Запалими вещества**

Като запалим материал се използва изсушена фиброзна целулоза с нишки с дължина между 50 и 250 µm и среден диаметър 25 µm ⁽³⁾. Материалът се суши до достигане на постоянно тегло на слоя с дебелина не повече от 25 mm при 105 °C в продължение на 4 часа и се оставя в сушилня в присъствие на консервант, докато изстине и стане подходящ за използване. Съдържанието на вода в сухия остатък целулоза не следва да надвишава 0,5 % сухо тегло ⁽⁴⁾. Ако е необходимо, времето на сушене се удължава до достигане на тези параметри ⁽⁵⁾. По време на изпитването трябва да се използва целулоза от една проба.

⁽¹⁾ Както например в рамките на правилата на ООН, свързани с транспорта.

⁽²⁾ Напр. в препратка (1) се използват 50 масови % перхлорна киселина и 40 масови % натриев хлорат.

⁽³⁾ Напр. хроматографска колона на Whatman с целулоза на прах CF 11, каталожен № 4021 050.

⁽⁴⁾ Потвърдено (напр.) чрез титруване по Карл-Фишер.

⁽⁵⁾ По друг начин това водно съдържание може да бъде постигнато (напр.) чрез нагряване при 105 °C във вакуум в продължение на 24 часа.

▼B

1.6.1.2. *Апаратура*

1.6.1.2.1. Съд под налягане

Изисква се съд под налягане. Съдът представлява цилиндричен стоманен съд под налягане с дължина 89 mm и външен диаметър 60 mm (вж. фигура 1). Двете повърхности са свързани с противоположните си страни (намалявайки напречното сечение на съда до 50 mm), за да се подобри прикрепването, докато се монтира пожарният хидрант и пробката с вентилационния отвор. Съдът, който има отвор с диаметър 20 mm, е вътрешно вдълбан във всеки край до такава дебелина, че там да бъде поставена едноинчова тръба по британския стандарт (BSP) или метричния еквивалент. Приспособлението за повишаване на налягането, под формата на разклонение (коляно), е завинтено към извивката на съда под налягане на 35 mm от единия край и е на 90° спрямо механично обработените повърхности. Вдълбнатината за него е с дълбочина 12 mm и е вътрешно резбована, за да приеме 1/2" BSP (или метричния еквивалент) външно резбования край на разклонението. Ако е необходимо, се използва инертно уплътнение, за да се осигури неподвижна газонепропусклива свързка. Разклонението продължава 55 mm след тялото на съда под налягане и има 6 mm отвор. Краят на разклонението е вжлебен и е предназначен да приеме датчика за налягане във вид на диафрагма. За измерване на налягането може да бъде използван всякакъв уред, при условие че не може да бъде повлиян от горещи газове или разграждащи се продукти и може да отговори на повишаващото се налягане в интервала 690-2 070 kPa в рамките на не повече от 5 ms.

Най-отдалеченият от разклонението край на съда под налягане е близо до пожарния хидрант, който е свързан с два електрода — единия изолиран от, а другия заземен към тялото на хидранта. Другият край на съда под налягане е близо до предпазната мембрана (предпазваща от налягане приблизително 2 200 kPa), здраво неподвижно закрепена за спирателния клапан, който има 20 mm отвор. Ако е необходимо, се използва уплътнение от инертен материал с пожарния хидрант, за да се осигури непронпусклива за газове неподвижна сглобка. Поддържащ стенд (фигура 2) поддържа апаратурата на подходящата височина през периода на използването ѝ. Обикновено той се състои от мека стоманена плоска основа с размери 235 mm × 184 mm × 6 mm и една 185-милиметрова дълга квадратна куха част с размери 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Частта е скосена от всяка от двете срещуположни страни в единия край по дължината на квадратната куха част, така че да се получи структура с две допълнителни плоски подпори, надхвърлящи с 86 mm дължината на цялата част. Краищата на тези плоски подпори са прорязани под ъгъл 60° към хоризонтала и са заварени към повърхността на основата. Прорезът с размери 22 mm ширина x 46 mm дълбочина се обработва от едната страна на по-горния край на основната част, така че когато монтираният съд под налягане е по-надолу, пожарният хидрант да спре първи в частта, поддържаща кутията, а коляното е разположено в прореза. Стоманен детайл с размери 30 mm ширина и 6 mm дебелина е заварен към по-ниската вътрешна повърхност на кутията и действа като дистанционен елемент (раздалечител). Два 7-милиметрови винта с крилчати глави, поставени на срещуположната повърхност, задържат неподвижен на място съда под налягане. Две стоманени шини с ширина 12 mm и дебелина 6 mm, заварени към стената на детайлите, допиращи се към основата на кутията, поддържат отдолу съда под налягане.

▼B

1.6.1.2.2. Система за запалване

Системата за запалване се състои от 25 cm дълга Ni/Cr жица с диаметър 0,6 mm и съпротивление 3,85 ohm/m. Жичата се намотава чрез използване на пръчка с диаметър 5 mm под формата на спирала и се прибавя към електродите на пожарния хидрант. Спиралата следва да е с някоя от конфигурациите, показани на фигура 3. Разстоянието между дъното на съда и долната повърхност на запалващата спирала следва да бъде 20 mm. Ако електродите не са подвижни, краищата на запалващата жица между серпентината и дъното на съда следва да бъдат изолирани с керамична обвивка. Жичата се загрева чрез постоянен електроизточник, осигуряващ поне 10 A ток.

1.6.2. Извършване на изпитването ⁽¹⁾

Апаратурата, цялостно сглобена с датчик за налягане и нагряваща система, но без позиционирана предпазна мембрана, се поддържа от пожарен хидрант в долния край. 2,5 g от изпитваната течност се смесват с 2,5 g изсушена целулоза в чаша от химично стъкло чрез използване на стъклена пръчка за разбъркване ⁽²⁾. За осигуряване на безопасност смесването следва да бъде извършвано при наличието на защитна преграда между оператора и сместа. Ако сместа се запали по време на смесването или разбъркването, не е необходимо изпитването да се провежда докрай. Сместа се вкарва на малки порции в съда под налягане и следва да сте сигурни, че тя се натрупва около запалващата спирала и прави добър контакт с нея. Важно е спиралата да не се изкриви по време на процеса на натрупване, тъй като това може да доведе до погрешни резултати ⁽³⁾. Предпазната мембрана е поставена в готовност и спирателният клапан е завинтен плътно. Напълненият съд се премества до поддържащия пожарен стенд, предпазната мембрана следва да бъде поставена най-отгоре в подходящ армиран смукателен (вентилационен) шкаф или в камерата за изгаряне. Електроенергия се доставя чрез свързване на пожарния хидрант с външен източник и се пуска ток със сила 10 A. Времето между започването на смесването и включването към енергоизточник не следва да надвишава 10 минути.

Сигналът, получаван чрез датчика за налягане, се записва от подходяща за целта система, която позволява едновременно оценяването и генерирането на траен запис на получения времеви контур на налягането (напр. свързани самопишещо и графично устройство). Сместа се нагрява, докато предпазната мембрана се пробие или докато изминат поне 60 секунди. Ако предпазната мембрана не се разкъса, сместа трябва да бъде оставена да се охлади, преди апаратурата внимателно да бъде демонтирана, като се вземат предпазни мерки срещу евентуално поставяне под налягане. Извършват се пет опита с изпитваното вещество и веществото(ата) за сравнение. Отчита се времето за повишаване на налягането от 690 kPa до 2 070 kPa над атмосферното налягане. Изчислява се средното време за повишаване на налягането.

В някои случаи веществата могат да генерират повишено налягане (твърде високо или твърде ниско), получено в резултат на химични реакции, които не определят окислителните свойства на веществото. В тези случаи може да се наложи изпитването да се повтори с инертно вещество, напр. диатомит (кизелгур), вместо целулоза, за да се изясни същността на реакцията.

⁽¹⁾ Смесите на окислителни с целулоза трябва да бъдат третирани като потенциално експлозивни и с тях да се работи с повишено внимание.

⁽²⁾ На практика това може да се постигне чрез приготвяне на смес в съотношение 1:1 от течността за изпитване и целулоза в по-големи количества от нужното за опита и прибавяне на 5 + 0,1 g в съда под налягане. Сместа трябва да се приготвя непосредствено при всеки отделен опит.

⁽³⁾ По-специално трябва да се избягва контакт между съседните намотки на спиралата.

▼B**2. ДАННИ**

Времето за повишаване на налягането за изпитваното вещество и веществото(ата) за сравнение. Времето за повишаване на налягането при изпитвания с инертно вещество, ако се провеждат такива.

2.1. ОБРАБОТВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Изчисляват се средните времена за повишаване на налягането за изпитваното вещество и за веществото(ата) за сравнение.

Изчислява се средното време за повишаване на налягането от изпитванията с инертно вещество (ако са провеждани такива).

Примери за някои резултати са представени в таблица 1.

Таблица 1
Примерни резултати ^(†)

Вещество ^(а)	Средно време за повишаване на налягането за смес 1:1 с целулоза (ms)
Амониев бихромат, наситен воден разтвор	20 800
Калциев нитрат, наситен воден разтвор	6 700
Железен нитрат, наситен воден разтвор	4 133
Литиев перхлорат, наситен воден разтвор	1 686
Магнезиев перхлорат, наситен воден разтвор	777
Никелов нитрат, наситен воден разтвор	6 250
Азотна киселина, 65 %	4 767 ^(а)
Перхлорна киселина, 50 %	121 ^(а)
Перхлорна киселина, 55 %	59
Калиев нитрат, 30 % воден разтвор	26 690
Сребърен нитрат, наситен воден разтвор	^(б)
Натриев хлорат, 40 % воден разтвор	2 555 ^(а)
Натриев нитрат, 45 % воден разтвор	4 133
<i>Инертно вещество</i>	
Вода:целулоза	^(б)

^(а) Средна стойност от сравнителни опити на различни лаборатории.

^(б) Не се достига максималното налягане от 2 070 kPa.

^(в) Наситените разтвори се приготвят при 20 °C.

^(†) Вж. препратка (1) за класификация по схемата на ООН за транспорт.

▼B**3. ОТЧИТАНЕ****3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Протоколът от изпитването следва да съдържа следната информация:

- идентичност, състав, чистота и т.н. на изпитваното вещество;
- концентрация на изпитваното вещество;
- процедура за сушене на използваната целулоза;
- съдържание на вода в използваната целулоза;
- резултати от измерванията;
- резултати от изпитванията с инертно вещество, ако има такива;
- изчислени средни стойности на времето за повишаване на налягането;
- всички отклонения от този метод и причините за тях;
- цялата допълнителна информация или бележки, свързани с интерпретирането на резултатите.

3.2. ИНТЕРПРЕТИРАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ⁽¹⁾

Резултатите от изпитването се оценяват въз основа на:

- а) наличието на спонтанно запалване на сместа от изпитваното вещество и целулозата; и
- б) сравнението между средното време, за което налягането се е повишило от 690 kPa до 2 070 kPa, и това при веществото(ата) за сравнение.

Течно вещество се счита за окислител, когато:

- а) смес в съотношение 1:1 от масата на веществото и на целулозата се самозапали спонтанно; или
- б) смес в съотношение 1:1 от масата на веществото и на целулозата покаже средно време за повишаване на налягането, по-малко или равно на средното време за повишаване на налягането на смес в съотношение 1:1 от масата на 65 тегл. % воден разтвор на азотна киселина и целулоза.

За да се избегнат неверни положителни резултати, ако е необходимо, резултатите, получени при изпитването на веществото с инертен материал, също могат да се вземат под внимание при интерпретирането на резултатите.

⁽¹⁾ Вж. препратка 1 за интерпретиране на резултатите съгласно правилата на ООН, свързани с транспорта, с използването на няколко вещества за сравнение.

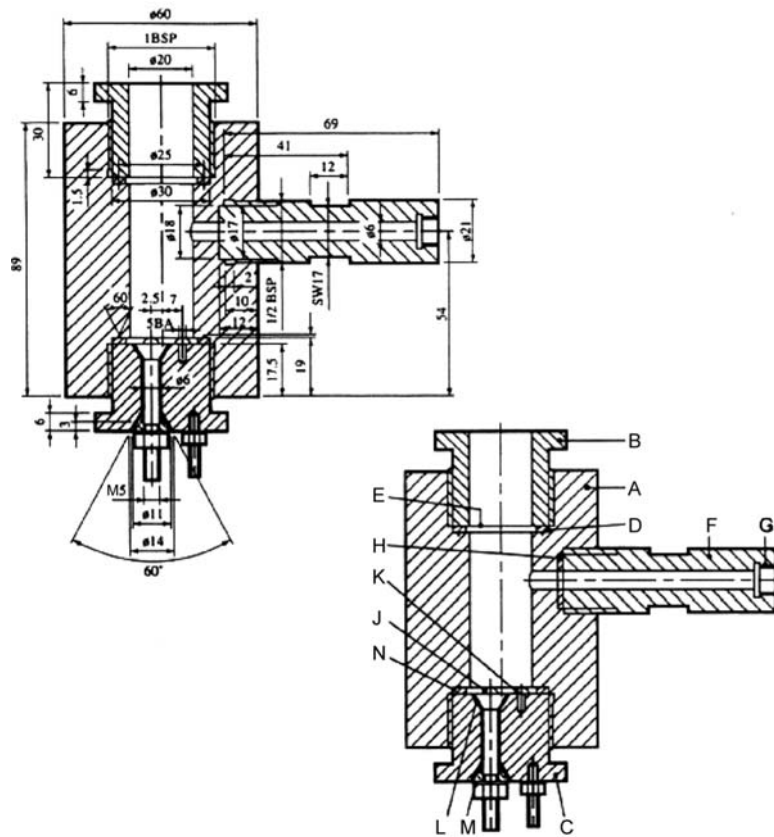
▼В

4. ПРЕПРАТКИ

Препоръки при транспорт на опасни стоки, ръководство за изпитвания и критерии. Трето преработено издание. Публикация на ООН №: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999 г., стр. 342. Метод О.2: Изпитване на оксидиращи течности.

Фигура 1

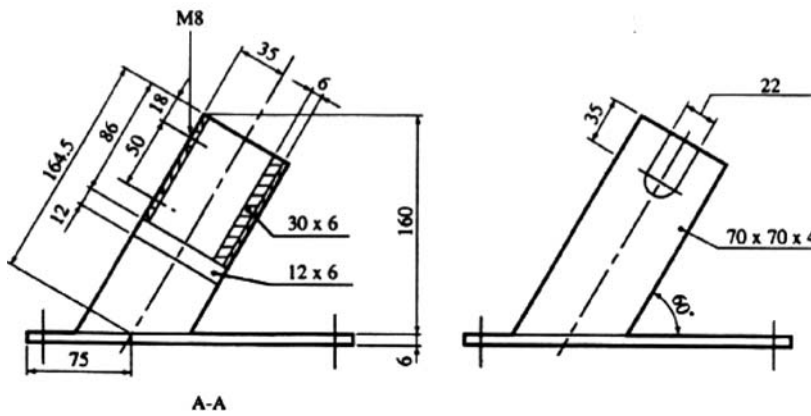
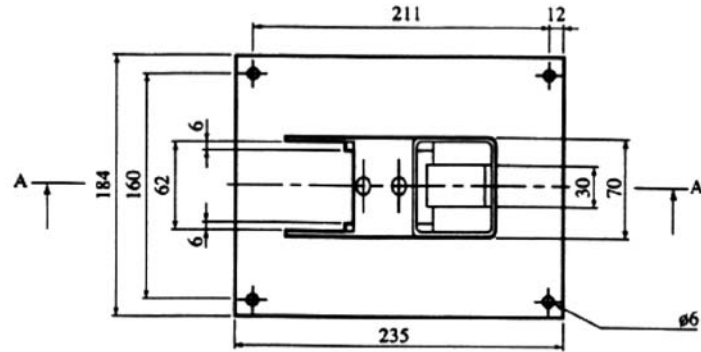
Съд под налягане



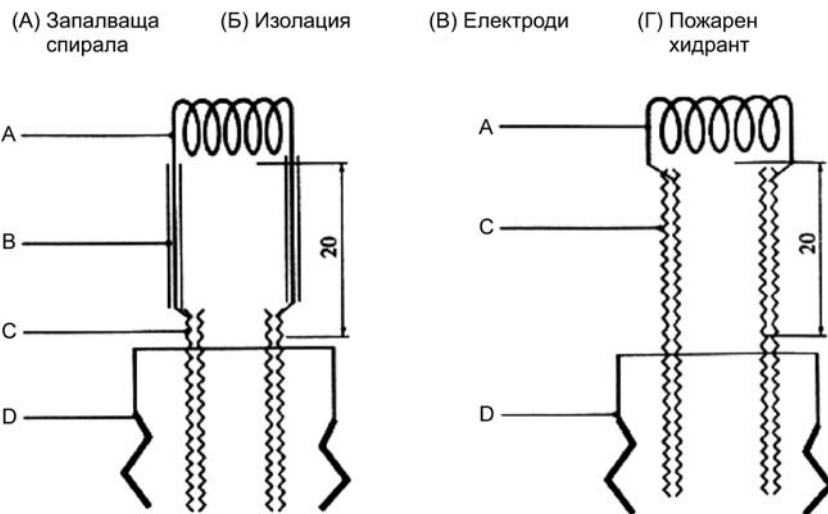
- | | | |
|---------------------------------------|--|--------------------------|
| (А) Тяло на съда под налягане | (Б) Предпазна мембрана със спирателен клапан | (В) Пожарен хидрант |
| (Г) Мек оловен пръстен | (Д) Предпазна мембрана | (Е) Разклонение (коляно) |
| (Ж) Глава на датчика за налягане | (З) Шайба | (И) Изолиран електрод |
| (Й) Заземен електрод | (К) Изолация | (Л) Стоманен конус |
| (М) Уплътнение на спираловидния канал | | |

▼B

Фигура 2
Поддържащ стенд



Фигура 3
Система на запалване



Забележка: може да бъде използвана всяка от тези конфигурации.

▼ **M1****A.22. ПРЕТЕГЛЕНА СПРЯМО ДЪЛЖИНАТА СРЕДНОГЕОМЕТРИЧНА СТОЙНОСТ НА ДИАМЕТЪРА НА ВЛАКНА****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Настоящият метод описва процедура за измерване на претеглената спрямо дължината средногеометрична стойност на диаметъра (LWGMD) на насипни изкуствени минерални влакна (МММФ). Тъй като LWGMD на всички влакна попада с 95 % вероятност в 95-процентния доверителен интервал ($LWGMD \pm$ две стандартни грешки) на пробата, определената стойност (стойност от изпитването) ще бъде долната 95-процентна доверителна граница на пробата (т.е. LWGMD — 2 стандартни грешки). Методът е въз основа на актуализация (юни 1994 г.) на проект на HSE за процедура за отрасъла, съгласуван на среща между Европейската асоциация на отрасъла на керамичните влакна (ECFIA) и HSE в Честър на 26.9.1993 г. и е разработен за и от втори междублабораторен опит (1, 2). Настоящият метод за измерване може да се използва за охарактеризиране на диаметъра на влакната на насипни материали или продукти, които съдържат МММФ, включително и огнеупорни керамични влакна (RCF), изкуствени стъкловлакна (ММВФ), кристални и поликристални влакна.

Претеглянето спрямо дължината е начин за компенсация на ефекта от разпределяне на диаметъра при късане на дълги влакна по време на вземане на проби или работа с материала. Геометричните статистически данни (средногеометрична стойност) се използват за измерване на разпределенията на големините на диаметрите на МММФ, тъй като тези диаметри обикновено имат разпределения на големината, които са приблизително логнормални разпределения.

Измерването на дължината и на диаметъра е както трудоемък, така и изискващ време процес, но ако бъдат измерени само онези влакна, които допират една безкрайно тънка линия от зрителното поле на сканиращ електронен микроскоп (СЕМ), тогава вероятността да бъде избрано определено влакно е пропорционална на неговата дължина. Тъй като то отчита дължината при изчисленията за претегляне спрямо дължината, единственото необходимо измерване е на диаметъра, и LWGMD–2СГ може да се изчисли, както е описано.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Частнца: Обект със съотношение на дължината към ширината, по-малко от 3:1.

Влакно: Обект със съотношение на дължината към ширината (стройност) най-малко 3:1.

1.3. ОБХВАТ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Методът е предназначен да разглежда разпределения на диаметъра, когато медианният диаметър е от 0,5 μm до 6 μm . По-големи диаметри могат да се измерват с по-малко увеличение на СЕМ, но в такъв случай методът ще бъде все по-ограничителен за по-тесни разпределения на влакната, като при медианни диаметри под 0,5 μm се препоръчва измерване с трансмисионен електронен микроскоп (ТЕМ).

▼ **M1**

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

Чрез ядково вземане на проба се вземат определен брой представителни проби от плъст от влакна или от влакна в насипно състояние. Дължината на така получените влакна се намалява чрез раздробяване и една представителна подпроба се разпръсква във вода. Вземат се аликвотни части от пробата и се прецеждат през поликарбонатен филтър с диаметър на порите 0,2 µm и се подготвят за изследване със сканиращ електронен микроскоп. Диаметрите на влакната се измерват с увеличение на екрана × 10 000 или по-голямо⁽¹⁾, като се използва метод на подбор в обсега на линия, който дава безпристрастна оценка на медианния диаметър. Изчислява се долният доверителен интервал от 95 % (въз основа на едностранно изпитване), за да се направи оценка за най-ниската стойност на средногеометричния диаметър на влакното на материала.

1.5. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

1.5.1. **Безопасност/предпазни мерки**

Личното експониране на намиращи се във въздуха влакна следва да бъде сведено до минимум и при боравене със сухите влакна следва да се използва смукателен шкаф или защитна камера с ръкавици. Следва да се провежда периодичен мониторинг на личното експониране, за да се определи ефективността на методите за контрол. При боравене с MMMF следва да се използват ръкавици за еднократна употреба, за да се намали дразненето на кожата и да се избегне кръстосано замърсяване.

1.5.2. **Апаратура/оборудване**

- Преса и форми (способни да постигнат 10 MPa).
- Поликарбонатни капилярни филтри (25 mm диаметър) с размер на порите 0,2 µm.
- Мембранен филтър от целулозен естер с размер на порите 5 µm като подсигуряващ филтър.
- Стъклен прибор за филтриране (или филтриращи системи за еднократна употреба), който да побира филтри с диаметър 25 mm (напр. стъкления комплект за микроанализи на Millipore, тип № XX10 025 00).
- Прясно дестилирана вода, филтрирана през филтър с размер на порите 0,2 µm, за да се отстранят микроорганизмите.
- Апарат за метализиране чрез запрашване със златна или златна/паладиева мишена.
- Сканиращ електронен микроскоп с разделителна способност, достигаща 10 nm и работещ с увеличение × 10 000.
- Разни: шпатули, скалпел тип 24, пинсети, тръби за СЕМ, въглеродно лепило или въглеродна залепваща лента, колоиден разтвор на сребро.
- Ултразвукова сонда или настолна ултразвукова вана.
- Прибор за вземане на ядрова проба или лабораторна замба за вземането на ядрови проби от плъст от MMMF.

⁽¹⁾ Тази увеличителна стойност е указана за влакна от 3 µm, за влакна от 6 µm може да е по-подходящо увеличение × 5 000.

▼ M1**1.5.3. Процедура на изпитване****1.5.3.1. Взимане на проби**

За плътст и кече се използва 25-милиметрова ядкова сонда или лабораторна замба, за да се вземат проби от напречното сечение. Те следва да бъдат разположени равномерно по широчината при малка дължина на плътста или ако са налични големи дължини от плътста, се вземат проби от произволно избрани зони. Същото оборудване може да се използва за вземане на случайни проби от свободна маса влакна. По възможност се вземат шест проби, които да отразят пространствените промени в насипния материал.

Шестте ядкови проби се раздробяват в 50-милиметрова форма при 10 МРа. Материалът се размесва с шпатула и се пресова отново при 10 МРа, след което се изважда от формата и се поставя в запечатана стъклена бутилка.

1.5.3.2. Подготовка на пробата

Ако е необходимо, свързващото органично вещество може да се отстрани, като влакната се поставят за около един час в пещ при 450 °С.

Оформете пробата с конус и след това я разделете на четири части (това следва да се извърши в смукателен шкаф).

С помощта на шпатула добавете малко количество (< 0,5 g) от пробата в 100 ml прясно дестилирана вода, която е била филтрирана през 0,2 µm мембранен филтър (могат да се използват алтернативни източници на свръхчиста вода, ако е доказано, че удовлетворяват изискванията). Разбърква се изцяло с помощта на ултразвукова сонда при мощност 100 W и регулирана така, че да се образува кавитация. (Ако не разполагате със сонда, използвайте следния метод — многократно разклатете и обърнете обратно в продължение на 30 секунди; в настолна ултразвукова вана за 5 минути; след това многократно разклатете и обърнете обратно за още 30 секунди).

Непосредствено след разбъркването на влакната вземете няколко аликвотни части (напр. три аликвотни части от 3, 6 и 10 ml) с пипета с широк отвор (2—5 ml вместимост).

Филтрирайте вакуумно всяка взета аликвотна част през поликарбонатен филтър 0,2 µm с допълнителен подсигуриращ филтър МЕС с пори 5 µm с помощта на 25-милиметрова стъклена фуния за филтриране с цилиндричен резервоар. Приблизително 5 ml от филтрираната дестилирана вода следва да се постави във фунията, а аликвотната част бавно се добавя във водата с помощта на пипета, чийто връх се държи под повърхността на течността. След тази процедура резервоарът и пипетата трябва да бъдат добре промити, тъй като фините влакна обикновено се разполагат в по-голяма степен по повърхността.

Внимателно отстранете филтъра и го отделете от допълнителния филтър, преди да го сложите в съд за изсушаване.

▼ M1

Със скалпел тип 24 отрежете с възвратно-постъпателно движение четвърт сектор или половината от филтъра с филтрираните отложения. Внимателно прикрепете отрязаната част към предметната плочка на СЕМ, като използвате залепваща въглеродна лепенка или въглеродно лепило. За подобряване на електрическия контакт по краищата на филтъра и предметната плочка следва да се нанесе колоидно сребро най-малко на три места. Когато лепилото/колоидното сребро изсъхне, чрез метализиране чрез запрашване покрийте с приблизително 50 nm златен или златен/паладиев слой повърхността на отложенията.

1.5.3.3. *Калибриране и работа със СЕМ*

1.5.3.3.1. Калибриране

Калибрирането на СЕМ следва да се проверява поне веднъж седмично (най-добре веднъж дневно) чрез използване на сертифицирана калибрираща решетка. Калибрирането се проверява спрямо сертифициран стандарт и ако измерената стойност (СЕМ) не е в рамките на $\pm 2\%$ от сертифицираната стойност, тогава калибрирането на СЕМ трябва да се регулира и да се провери отново.

СЕМ следва да може да измери най-малко минимален видим диаметър от 0,2 μm , като се използва реална матрица образец при увеличение $\times 2\,000$.

1.5.3.3.2. Работата

Със СЕМ следва да се работи с увеличение 10 000⁽¹⁾ при условия, които осигуряват добра резолюция и задоволителен образ при бавна скорост на сканиране, например 5 секунди на кадър. Въпреки че работните изисквания на различните СЕМ може да варират, обикновено за постигане на най-добра видимост и резолюция при материали със сравнително ниско атомно тегло следва да се използва ускорително напрежение 5—10 keV с малка големина на петното и късо работно разстояние. Тъй като се използва линейно трасиране, следва да се използва наклон от 0°, за да се сведе до минимум повторното фокусиране или ако СЕМ е с евцентрично стъпало, следва да се използва евцентричното работно разстояние. Ако материалът не съдържа малки (по диаметър) влакна и диаметрите на влакната са големи (> 5 μm), може да се използва по-малко увеличение.

1.5.3.4. *Измерване*

1.5.3.4.1. Изследване с ниско увеличение за оценка на пробата

Първоначално пробата се изследва с ниско увеличение, за да се определи дали има сплъстяване на големи влакна и да се оцени гъстотата на влакната. При наличие на прекомерно сплъстяване се препоръчва да се приготви нова проба.

За статистическата точност е необходимо да се измери минимален брой влакна и високата им гъстота може да изглежда за предпочитане, тъй като изследването на празни полета отнема време и не допринася за анализа. Обаче ако филтърът е претоварен, става трудно да се измерят всички измерими влакна и тъй като малките влакна може да са закрити от по-големи, могат да бъдат пропуснати.

⁽¹⁾ За влакна от 3 μm вж. предходната бележка.

▼ **M1**

Отклонение към надценяване на LWGMD може да възникне при гъстота на влакната над 150 влакна на 1 милиметър линейно трасиране. От друга страна, ниските концентрации на влакна биха увеличили времето за анализ и често е по-рентабилно да се изготви проба с гъстота на влакната, близка до оптималната, отколкото да се продължава броенето при филтри с ниска концентрация. Оптималната гъстота на влакната би трябвало да даде средно около едно или две преброими влакна за зрително поле при увеличение 5 000. Независимо от това оптималната гъстота ще зависи от размера (диаметъра) на влакната, така че е необходимо операторът да използва известна експертна преценка, за да реши дали плътността на влакното е близка до оптималната или не.

1.5.3.4.2. Претегляне спрямо дължината на диаметрите на влакната

Отчитат се единствено онези влакна, които допират (или пресичат) една (безкрайно) тънка линия, очертана на екрана на СЕМ. Поради тази причина се начертава хоризонтална (или вертикална) линия през центъра на екрана.

Като алтернативен метод се поставя точка в центъра на екрана и пробата се сканира без прекъсване в една посока през филтъра. Диаметърът на всяко влакно със стройност, по-голяма от 3:1, което допират или пресича тази точка, се измерва и записва.

1.5.3.4.3. Измерване на влакната

Препоръчва се да се измерят минимум 300 влакна. Всяко влакно се измерва само един път в точката на пресичане с линията или в точката, очертана върху образа (или близо до точката на пресичане, ако ръбовете на влакното са неясни). Ако попаднете на влакна с различни напречни сечения, следва да се използва измерване, представящо средния диаметър на влакното. Трябва да се внимава при определяне на ръбовете и измерване на най-късото разстояние между ръбовете на влакното. Измерването може да се извърши в момента или впоследствие на базата на съхранени образи или снимки. Препоръчва се използването на полуавтоматични системи за измерване на образи, които прехвърлят данните директно в електронна таблица, тъй като пестят време, отстраняват грешки при вписването и изчисленията могат да бъдат автоматизирани.

Краищата на дълги влакна следва да се проверяват при ниско увеличение, за да се гарантира, че те не завиват обратно в полето на измерване и че са измерени само веднъж.

2. ДАННИ

2.1. ОБРАБОТВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Диаметрите на влакната обикновено не са с нормално разпределение. Въпреки това чрез логаритмично преобразуване е възможно да се получи разпределение, което се приближава до нормалното.

Изчислете средноаритметичната стойност (среден $\ln D$) и стандартното отклонение ($SD_{\ln D}$) на логаритъма с основа e на стойностите ($\ln D$) на n диаметри на влакна (D).

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

▼ M1

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

Стандартното отклонение се дели на квадратния корен на броя измервания (n), за да се получи стандартната грешка ($SE_{\ln D}$).

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

Извадете два пъти стандартната грешка от средната стойност и изчислете експоненциалната на тази стойност (средната стойност минус две стандартни грешки), за да получите средногеометричната стойност минус две стандартни геометрични грешки.

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

3. ДОКЛАДВАНЕ**ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Протоколът от изпитването следва да включва най-малко следната информация.

— Стойността на LWGMD-2SE.

— Всички отклонения и особено онези, които биха могли да повлияят на прецизността и точността на резултатите, с подходящи обосновки.

4. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

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

▼ **M4****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 стъкленица“ (2) и определянето на P_{OW} от поведението на задържане при HPLC с обръната фаза (3). При метода „разклащане в стъкленица“ 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 „разклащане в стъкленица“ (2) би могъл да доведе до погрешни резултати.

▼ **M4**

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 уравниават 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 разклащане в стъклена чаша, могат да бъдат намалени чрез предложени тук опит с бавно разбъркване. При опита с бавно разбъркване водата, 1-октанолът и изпитваното вещество се уравниават 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.

▼ **M4**

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 известен 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):

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

▼ **M4**

където

$$SR = S_{\text{oct}}/S_w(\text{в mol/l}),$$

и на връзката, посочена от Lyman (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 всякакво 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 µm 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 разреждени 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),

▼ **M4**

- 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 разрежения изходен разтвор. Ако измерената концентрация съответства на разреждането, разреженият 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 фазата на наситения с вода 1-октанол, както и във фазата 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 фазата 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.
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.

⁽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.

▼ **M4**

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 предпочита 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 ($> 0,5\text{ cm}$), 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.

▼ **M4***Условия на изпитването*

34. По време на изпитването реакционният съд е термостатиран, за да се намалят колебанията на температурата до под 1 °C. Анализът трябва да се извършва при температура 25 °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 обезпрашена (доколкото е възможно) среда.
37. Системата 1-октанол—вода се разбърква, докато се постигне равновесие. При пилотен опит продължителността на периода за уравнивяване 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 p -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 (декалоробифенил) 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.

▼ M4*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 µl) 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.

ДАННИ 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.

▼ **M4****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 p -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 определения 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 повторемостта 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.

▼ **M4****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 mm 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:

- повтораемост 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 ѝ грешка,
- обсъждане и интерпретиране на резултатите,

▼ **M4**

— 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 качеството/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. „Налигане 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.

▼M4

- (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.

▼ **M4***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

▼ **M4**

Обща маса на изпитваното вещество (mg)	Маса _{окт} /Маса _{вода}	Маса _{H2O} (mg)	Конц _{H2O} (mg/l)	Маса _{окт} (mg)	Конц _{окт} (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Изчисляване на обеми

Минимален необходим за фазата на H₂O обем за всяка концентрация на ГО

log K _{ow}	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.

▼ **M4****Обобщение на необходимите обеми като функция на разтворимостта във вода и на log P_{ow}**Минимален необходим за фазата на H₂O обем за всяка концентрация на ГО (ml)

log P _{ow}	S _w (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
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

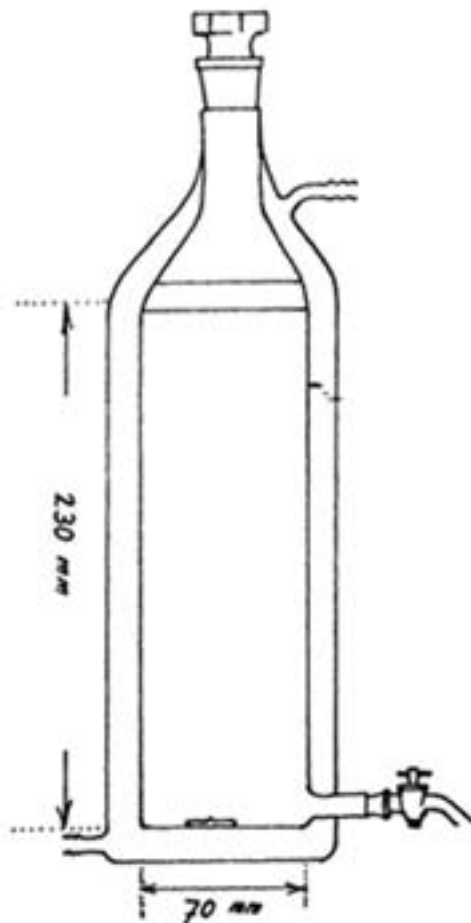
▼ **M4**

log P _{ow}	S _w (mg/l)	LOD (microgram/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Обем, използван за ГО (l)		0,1.					

▼ M4

Допълнение 2

Примерен съд за изпитване, покрит със стъкло, за опита с бавно разбъркване за определяне на P_{0W}



▼ **M6****A.24. КОЕФИЦИЕНТ НА РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ (N-ОКТАНОЛ/ВОДА), МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ С ВИСОКОЕФЕКТИВНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ (ВЕТХ)****УВОД**

Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 117 (2004).

1. Коефициентът на разпределение (P) се дефинира като съотношението между равновесните концентрации на разтвореното вещество в двуфазна система, която се състои от два практически несмесващи се разтворителя. В случая с n-октанол и вода

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{octanol}}{C_{\text{water}}}$$

коефициентът на разпределение (P) представлява съотношение между две концентрации, безразмерна величина е и обикновено се дава във формата на десетичен логаритъм.

2. P_{ow} е ключов параметър при проучвания на съдбата в околната среда на химични вещества. Установена е висока значимост на взаимовръзката между P_{ow} вещества в нейонизирана форма и тяхната биоаккумуляция в рибата. Освен това е доказано, че P_{ow} е полезен параметър при прогнозиране на адсорбцията върху почвата и седиментите, и за определяне на количествените зависимости структура-активност за широк спектър от биологични ефекти.
3. Първоначалното предложение за този метод за изпитване се основаваше на статия с автори С.V. Eadsforth и Р. Moser (1). Разработването на метода за изпитване беше координирано с междулабораторно сравнително изпитване на ОИСП от Агенцията по околна среда на Федерална република Германия през 1986 г. (2).

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

4. Стойности на $\log P_{ow}$ в диапазона от -2 до 4 (в някои случаи до 5 и повече) ⁽¹⁾ могат да бъдат опитно определени по метода „разклащане в стъкления“ (глава А.8 от настоящото приложение; насоки за изпитване 107 на ОИСП). Методът с ВЕТХ обхваща $\log P_{ow}$ в диапазон от 0 до 6 (1) (2) (3) (4) (5). Този метод може да изисква прогнозна оценка на P_{ow} за определяне на подходящи референтни вещества и за подкрепа на всички заключения, направени въз основа на данните, получени от изпитването. Методите за изчисляване са разгледани накратко в допълнението към настоящия метод за изпитване. ВЕТХ е в изократен режим на работа.
5. Стойностите на P_{ow} зависят от условията на околната среда, като например температурата, рН, йонната сила и т.н., и те следва да бъдат определени в експеримента за правилното интерпретиране на данните за P_{ow} . За веществата, които могат да съществуват в йонизирано състояние, е възможно друг метод (напр. проект за насоки на ОИСП относно рН-метричен метод за йонизирани вещества (6)) да стане наличен и да се използва като алтернативен метод. Въпреки че този проект за насоки на ОИСП може да е подходящ за определянето на P_{ow} за посочените вещества, които могат да съществуват в йонизирано състояние, в някои случаи е по-целесъобразно да се използва методът с ВЕТХ при стойности на рН, срещани в околната среда (вж. параграф 9).

⁽¹⁾ Дадена е горна граница поради необходимостта да се достигне фаза на пълно разделяне след коригиране на равновесието на разпределението и преди пробоземане за аналитично определяне. Ако се вземат съответни мерки, горната граница може да се разшири до по-високи стойности на P_{ow} .

▼ M6

ПРИНЦИП НА МЕТОДА

6. Изпитването с ВЕТХ с обърната фаза се провежда в аналитични колони, запълнени с налична в търговската мрежа твърда фаза, съдържаща въглеродороди с дълги вериги (например C₈, C₁₈), химически свързани със силикагел.
7. При пренасянето си от подвижната фаза през колоната химикалтът, инжектиран в такава колона, се разпределя между подвижната фаза на разтворителя и неподвижната фаза на въглеродородите. Веществата се задържат пропорционално на своите коефициенти на разпределение въглеродород-вода, като хидрофилните вещества се елуират първи, а липофилните вещества — последни. Времето на задържане се описва с капацитета „k“, който се дава с израза:

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

където t_R = времето на задържане на изпитваното вещество, а t_0 = мъртвото време, т.е., средното време, необходимо на една молекула от разтворителя да премине през колоната. Не се изисква прилагането на количествени аналитични методи и е необходимо единствено определянето на времената на задържане.

8. Коефициентът на разпределение октанол/вода на дадено изпитвано вещество може да се изчисли чрез опитно определяне на капацитета „k“ за него и след това поставяне на „k“ в следната формула:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

където

a, b = коефициенти на линейна регресия.

Уравнението по-горе може да бъде получено чрез линейна регресия на \log на коефициентите на разпределение октанол/вода на референтни вещества спрямо \log на капацитетите на тези референтни вещества.

9. Методът на ВЕТХ с обърната фаза позволява коефициентите на разпределение да се определят в диапазон на $\log P_{ow}$ от 0 до 6, но той може да бъде разширен така, че да обхване диапазон на $\log P_{ow}$ между 6 и 10 в изключителни случаи. За тази цел може да е необходимо модифициране на подвижната фаза (3). Методът не може да се прилага за силни киселини и основи, метални комплекси, вещества, които реагират с елуента или повърхностно активни средства. При веществата, които могат да съществуват в йонизирано състояние, измервания могат да се извършват върху тяхната нейонизирана форма (свободна киселина или свободна основа) само чрез използване на подходящ буфер с рН, по-ниско от pK_a за свободната киселина или по-високо от pK_a за свободната основа. Алтернативно, рН-метричният метод за изпитване на веществата, които могат да съществуват в йонизирано състояние (6) може да стане наличен и да се използва като алтернативен метод (6). Ако стойността на $\log P_{ow}$ се определя за използване при класифициране на опасността за околната среда или в оценката на риска за околната среда, изпитването трябва да се провежда при обхват от стойности на рН, срещан в естествени условия, т.е., обхват от 5,0 — 9.
10. В някои случаи присъствието на примеси може да затрудни интерпретирането на резултатите, защото определянето на пиковите става несигурно. За смеси, които водят до неразделена ивица, следва да бъдат протоколирани горната и долната граница на $\log P_{ow}$ и % от площта за всеки $\log P_{ow}$ пик. За смеси, които са група от хомолози, следва също да се посочи среднопретеглената стойност на $\log P_{ow}$ (7), изчислена въз основа на отделните стойности на P_{ow} и съответните им стойности за % от площта (8). Всички пикове, които дават площ от 5 % или повече спрямо общата площ на пиковите, трябва да се вземат под внимание при изчислението (9):

▼ M6

$$\text{weighted average log } P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\text{area } \%)}{\text{total peak area } \%} = \frac{\sum (\log P_{owi})(\text{area } \%_i)}{\sum_i \text{area } \%}$$

Среднопретеглената стойност на $\log P_{ow}$ е валидна само за вещества или смеси (напр. талово масло), състоящи се от хомолози (напр. от алкани). Смеси могат да бъдат измервани със смислени резултати, при условие че използваният аналитичен детектор има същата чувствителност към всички вещества в сместа, и че те могат да бъдат измерени по подходящ начин.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

11. Дисоциационната константа, структурната формула и разтворимостта в подвижната фаза следва да бъдат известни преди използването на метода. Освен това би била полезна и информацията относно хидролизата.

КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

12. За да се увеличи доверителността на резултатите, трябва да се правят по две определяния.
 - Повторяемост: Стойността на $\log P_{ow}$, получена при повтаряни измервания, направени при идентични условия и с използването на един и същи набор от референтни вещества, трябва да попада в обхват $\pm 0,1 \log$ единици.
 - Възпроизводимост: Ако измерванията се повтарят с различен набор от референтни вещества, резултатите може да се различават. Обикновено коефициентът на корелация R за връзката между $\log k$ и $\log P_{ow}$ за набор от изпитвани вещества е около 0,9, което съответства на коефициент на разпределение октанол/вода от $\log P_{ow} \pm 0,5 \log$ единици.
13. Междулабораторното сравнително изпитване е показало, че по метода на ВЕТХ могат да бъдат получени стойности на $\log P_{ow}$ в рамките на $\pm 0,5$ единици от тези по метода „разклащане в стъкленница“ (2). Други сравнения могат да бъдат намерени в посочената литература (4) (5) (10) (11) (12). Графиките с корелациите, основаващи се на структурно свързани референтни вещества, дават най-точните резултати (13).

РЕФЕРЕНТНИ ВЕЩЕСТВА

14. За да се определи корелацията между измерения капацитет k на дадено вещество и неговия P_{ow} , трябва да се изготви калибрационна графика, като се използват най-малко 6 точки (вж. параграф 24). Подборът на подходящи референтни вещества е по преценка на потребителя. Референтните вещества обикновено следва да имат стойности на $\log P_{ow}$, които обхващат $\log P_{ow}$ на изпитваното вещество, т.е., най-малко едно референтно вещество трябва да има по-високо P_{ow} от това на изпитваното вещество, а друго — по-ниско P_{ow} от това на изпитваното вещество. Екстраполацията трябва да се използва само в изключителни случаи. За предпочитане е тези референтни вещества да са структурно свързани с изпитваното вещество. Стойностите на $\log P_{ow}$ на референтните вещества, използвани за калибрирането, следва да се основават на надеждни експериментални данни. Въпреки това, за вещества с високи стойности на $\log P_{ow}$ (обикновено повече от 4) могат да се използват изчислени стойности, освен ако не са налични надеждни експериментални данни. Ако са използвани екстраполирани стойности, трябва да се посочи пределна стойност.
15. В литературните източници (14) и (15) могат да се намерят подробни списъци със стойностите на $\log P_{ow}$ за много групи от химикали. Ако не са налични данни за коефициентите на разпределение на структурно свързани вещества, може да се използва по-общо калибриране, извършено с други референтни вещества. В таблица 1 са посочени препоръчителни референтни вещества и техните P_{ow} стойности. За веществата, които могат да съществуват в йонизирано състояние, дадените стойности се отнасят за нейонизираната форма. Стойностите са проверени по отношение на достоверността и качеството по време на междулабораторното сравнително изпитване.

▼ M6

Таблица 1

Препоръчителни референтни вещества

	CAS номер	Референтно вещество	log P _{ow}	pKa
1	78-93-3	2-Бутанон (Етилметилкетон)	0,3	
2	1122-54-9	4-Ацетилпиридин	0,5	
3	62-53-3	Анилин	0,9	
4	103-84-4	Ацетанилид	1,0	
5	100-51-6	Бензилов алкохол	1,1	
6	150-76-5	4-Метоксифенол	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Феноксиоцетна киселина	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	Фенол	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-Динитрофенол	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Бензонитрил	1,6	
11	140-29-4	Фенилацетонитрил	1,6	
12	589-18-4	4-Метилбензилов алкохол	1,6	
13	98-86-2	Ацетофенон	1,7	
14	88-75-5	2-Нитрофенол	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	3-Нитробензоена киселина	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-Хлоранилин	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Нитробензен	1,9	
18	104-54-1	Цинамилов алкохол (Канелен алкохол)	1,9	
19	65-85-0	Бензоена киселина	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	<i>p</i> -Крезол	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (транс)	Канелена киселина	2,1	pKa = 3,89 (<i>цис</i>) 4,44 (<i>транс</i>)
22	100-66-3	Анизол	2,1	
23	93-58-3	Метилбензоат	2,1	
24	71-43-2	Бензен	2,1	
25	99-04-7	3-Метилбензоена киселина	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-Хлорофенол	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Трихлоретилен	2,4	
28	1912-24-9	Атразин	2,6	
29	93-89-0	Етилбензоат	2,6	

▼ M6

	CAS номер	Референтно вещество	log P _{ow}	pKa
30	1194-65-6	2,6-Дихлоробензонитрил	2,6	
31	535-80-8	3-Хлоробензоена киселина	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	Толуен	2,7	
33	90-15-3	1-Нафтол	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-Дихлороанилин	2,8	
35	108-90-7	Хлоробензен	2,8	
36	1746-13-0	Алилфенилов етер	2,9	
37	108-86-1	Бромобензен	3,0	
38	100-41-4	Етилбензен	3,2	
39	119-61-9	Бензофенон	3,2	
40	92-69-3	4-Фенилфенол	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Тимол	3,3	
42	106-46-7	1,4-Дихлоробензен	3,4	
43	122-39-4	Дифениламин	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Нафтаген	3,6	
45	93-99-2	Фенилбензоат	3,6	
46	98-82-8	Изопропилбензен	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-Трихлорофенол	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Бифенил	4,0	
49	120-51-4	Бензилбензоат	4,0	
50	88-85-7	6-втор-Бутил-2,4-динитрофенол	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-Трихлоробензен	4,2	
52	143-07-7	Додеканова киселина	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Дифенилов етер	4,2	
54	85-01-8	Фенантрен	4,5	
55	104-51-8	n-Бутилбензен	4,6	
56	103-29-7	Дибензил	4,8	
57	3558-69-8	2,6-Дифенилпиридин	4,9	
58	206-44-0	Флуорантен	5,1	
59	603-34-9	Трифениламин	5,7	
60	50-29-3	ДДТ	6,5	

▼ **M6**

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Предварителна преценка на коефициента на разпределение

16. Ако е необходимо, коефициентът на разпределение на изпитваното вещество се оценява, за предпочитане, чрез изчислителни методи (вж. допълнението) или, когато е уместно, чрез използването на съотношението на разтворимостите на изпитваното вещество в чистите разтворители (10).

Апаратура

17. Изисква се течен хроматограф, оборудван с помпа с ниско равнище на пулсации и подходящ детектор. УВ детекторът с дължина на вълната 210 nm или рефрактометричният детектор са приложими към голямо разнообразие групи от химикали. Присъствието на полярни групи в неподвижната фаза може значително да влоши действието на колоната за ВЕТХ. Затова неподвижните фази трябва да имат минимален процент от полярни групи (16). Могат да се използват търговските пълнители от микрочастици за обърнати фази или готови напълнени колони. Между инжекционната система и аналитичната колона може да се постави предпазна колона.

Мобилна фаза

18. За изготвянето на елуиращи разтворители (които се дегазират преди употреба) се използват метанол и дестилирана или дейонизирана вода с чистота „за ВЕТХ“. Използва се изократно елуиране. Следва да се използват съотношения метанол/вода с минимално съдържание на вода от 25 %. Обикновено сместа метанол-вода 3:1 (v/v) е подходяща за елуиране на вещества с $\log P = 6$ в рамките на един час при скорост на потока = 1 ml/min. За вещества със стойности на $\log P$ по-високи от 6 може да се наложи намаляване на времето за елуиране (също и на референтните вещества), като се намали полярността на подвижната фаза или дължината на колоната.
19. Както изпитваните, така и референтните вещества трябва да са разтворими в подвижната фаза в концентрации, достатъчни да позволят откриването им. Добавките към сместа от метанол и вода могат да се използват само в изключителни случаи, тъй като те променят свойствата на колоната. В тези случаи трябва да се потвърди, че времето на задържане на изпитваните и референтните вещества не е повлияно. Ако сместа метанол-вода не е подходяща, може да се използва смес от друг органичен разтворител и вода, например етанол-вода, ацетонитрил-вода или изопропилов алкохол (2-пропанол)-вода.
20. Стойността на рН на елуента е решаваща за веществата, които могат да съществуват в йонизирано състояние. Тя трябва да бъде в работния обхват от рН на колоната, обикновено между 2 и 8. Препоръчва се използването на буфери. Трябва да се внимава да се избегне утаяването на соли и замърсяването на колоната, което се получава при някои смеси органична фаза/буфер. Измерванията с ВЕТХ с неподвижна фаза на базата на силикагел при рН над 8 обичайно не се препоръчват, тъй като употребата на алкална подвижна фаза може да доведе до бързо влошаване на качествата на колоната.

Разтворени вещества

21. Изпитваните и референтните вещества трябва да са достатъчно чисти, за да се определят пиковете за съответните вещества в хроматограмите. Ако е възможно, веществата, които ще се изпитват, и тези, които ще се използват за калибриране, се разтварят в подвижната фаза. Ако за разтваряне на изпитваните и референтните вещества се използва различен от подвижната фаза разтворител, подвижната фаза следва да се използва за крайното разреждане преди инжектирането.

Условия на изпитването

22. Температурата по време на измерването не бива да се променя с повече от ± 1 °C.

▼ **M6****Определяне на мъртвото време t_0**

23. Мъртвото време t_0 може да бъде измерено чрез използване на органични вещества, които не се задържат (например тиоуреа или формамид). Мъртвото време може да бъде получено по-прецизно с измерените времена на задържане, измерено или с набор от около седем члена на хомоложен ред (например *n*-алкилметилкетони) (17). Времената на задържане $t_R(n_C + 1)$ се нанасят срещу $t_R(n_C)$, където n_C е броят на въглеродните атоми. Получава се права линия $t_R(n_C + 1) = A t_R(n_C) + (1 - A)t_0$, където A , представляващо $k(n_C + 1)/k(n_C)$, е константа. Мъртвото време t_0 се получава от отсечката $(1 - A)t_0$ и наклона A .

Регресионно уравнение

24. Следващата стъпка е да се начертае корелация на $\log k$ спрямо $\log P$ за подходящи референтни вещества със стойности на $\log P$ близки до очакваната стойност на изпитваното вещество. На практика се инжектират едновременно от 6 до 10 референтни вещества. Времената на задържане се определят за предпочитане на записващ интегратор, свързан към детектора. Съответните логаритми от капацитета, $\log k$, се нанасят като функция от $\log P$. Регресионното уравнение се съставя през равномерни интервали поне веднъж дневно, така че да бъдат отчетени възможните изменения в работата на колоната.

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА P_{ow} НА ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

25. Изпитваното вещество се инжектира в най-малките откриваеми количества. Времето на задържане се определя с две повторения. Коефициентът на разпределение на изпитваното вещество се получава чрез интерполация на изчисления капацитет върху калибрационната крива. За много ниски или много високи коефициенти на разпределение се налага да се извърши екстраполация. Особено в тези случаи внимание трябва да се обърне на доверителните граници на регресионната права. Ако времето на задържане на дадена проба е извън диапазона на времената на задържане, получени за еталоните, следва да бъде посочена пределна стойност.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Протокол от изпитването**

26. В протокола трябва да се включи следното:
- ако са определени — предварителната оценка на коефициента на разпределение, прогнозните стойности и използваният метод; ако е използван изчислителен метод — пълното му описание, включително идентификация на базата данни и подробна информация относно подбора на фрагментите;
 - изпитваните и референтните вещества: чистотата, структурната формула и CAS номера,
 - описание на оборудването и работните условия: аналитичната колона, предпазната колона,
 - подвижната фаза, детекторите, температурният обхват, pH;
 - профилите на елуиране (хроматограмите);
 - мъртвото време и как е измерено;
 - данните за задържането и стойностите на $\log P_{ow}$ от литературата — за референтните вещества, използвани при калибрирането;
 - подробности за изгладената регресионна права ($\log k$ спрямо $\log P_{ow}$) и коефициентът на корелация на правата, включително доверителни интервали;

▼ M6

- данните за средното време на задържане и интерполираната стойност на $\log P_{ow}$ на изпитваното вещество;
- за смеси: профил на елуиране (хроматограма) с посочени гранични стойности;
- стойностите на $\log P_{ow}$ спрямо % от площта за $\log P_{ow}$ пика;
- изчислението с използването на регресионна права;
- изчислената среднопретеглена стойност на $\log P_{ow}$, където е целесъобразно.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere*. 12, 1459.
- (2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss and H.J. Poremski. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. *Chemosphere*. 17, 361.
- (3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. *Pesticide Science*. 17, 311.
- (4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. *Pesticide Science*. 12, 219.
- (5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. *Chemosphere*. 10, 73.
- (6) OECD (2000). Guideline for Testing of Chemicals — Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Draft Guideline, November 2000.
- (7) OSPAR (1995). „Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995“, Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20–24 February 1995.
- (8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez and C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. August.
- (9) E. A. Vik, S. Bakke and K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. *Environmental Modelling & Software* Vol. 13, pp. 529-537.
- (10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem and K. Sundh-Nygård. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. *Chemosphere*. 9, 683.
- (11) W.E. Hammers, G.J.Meurs and C.L. De-Ligny. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. *J. Chromatography* 247, 1.
- (12) J.E. Haky and A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. *J. Liq. Chromatography*. 7, 675.
- (13) S. Fujisawa and E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Biomedical Materials Research*. 15, 787.

▼M6

- (14) C. Hansch and A. J. Leo. (1979). *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*. John Willey, New York.
- (15) C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir. (1982). *Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity* — Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.
- (16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther.* 14, 479.
- (17) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, and J. Inczedy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. *J. Liq. Chromato.* 3, 1669.

▼ **M6***Допълнение***Методи за изчисляване на P_{ow}** **ВЪВЕДЕНИЕ**

1. Настоящото допълнение е кратко въведение в изчисляването на P_{ow} . За допълнителна информация читателят се насочва към учебниците (1) (2).
2. Изчислените стойности на P_{ow} се използват за:
 - вземането на решение кой експериментален метод да се използва: метод „разклащане в стъкленица“ за $\log P_{ow}$ между -2 и 4 , и метод с BETX за $\log P_{ow}$ между 0 и 6 ;
 - избора на условия, които следва да се използват при BETX (референтни вещества, съотношение метанол/вода);
 - проверката на достоверността на стойностите, получени чрез експериментални методи;
 - получаване на оценка, когато не могат да бъдат приложени експериментални методи.

Принцип на изчислителните методи

3. Предложените тук изчислителни методи се основават на теоретичното фрагментиране на молекулата на подходящи подструктури, за които са известни надеждни нараствания на $\log P_{ow}$. Стойността на $\log P_{ow}$ се получава, като се съберат стойностите на фрагментите ценности и корекционните членове за вътрешномолекулните взаимодействия. Налични са списъци с константите за фрагментите и корекционните членове (1)(2)(3)(4)(5)(6). Някои от тях се осъвременяват редовно (3).

Надеждност на изчислените стойности

4. По принцип надеждността на изчислителните методи намалява с увеличаването на сложността на изпитваното вещество. В случаите на прости молекули с ниски молекулни тегла и една или две функционални групи могат да се очакват отклонения от $0,1$ до $0,3 \log P_{ow}$ единици между резултатите, получени по различни методи за фрагментиране, и измерените стойности. Границите на грешката ще зависят от надеждността на използваните константи за фрагментите, от възможността да се разпознаят вътрешномолекулните взаимодействия (например водородни връзки) и от коректното използване на корекционните членове. В случай на йонизиращи вещества трябва да бъдат взети предвид зарядът и степента на йонизацията (10).

 π -метод на Фуджита-Ханш

5. Константата за хидрофобен заместител, π , първоначално въведена от Fujita et al. (7), се определя като:

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

където PhX е ароматно производно, а PhH е базовото вещество.

$$\begin{aligned} \text{напр. } \pi_{Cl} &= \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}) - \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_6) \\ &= 2,84 - 2,13 \\ &= 0,71 \end{aligned}$$

π -методът представлява интерес основно за ароматни вещества. π -стойностите на голям брой заместители са на разположение (4)(5).

Метод на Рекер

6. При използване на метода на Рекер (8) стойността на $\log P_{ow}$ се изчислява, както следва:

$$\text{Log } P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{interaction terms})$$

▼ **M6**

където a_i е броят пъти, които даден фрагмент се среща в молекулата, а f_i е нарастването на $\log P_{ow}$ на фрагмента. Корекционните членове могат да се представят като интегрален множител на една обща константа C_m (така наречената „магическа константа“). Константите за фрагментите f_i и C_m се определят от списък от 1 054 експериментално получени стойности на P_{ow} на 825 вещества, като се използва множествен регресионен анализ (6)(8). Определянето на корекционните членове се извършва по определени правила (6)(8)(9).

Метод на Ханш-Лео

7. При използване на метода на Ханш-Лео (4) стойността на $\log P_{ow}$ се изчислява, както следва:

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

където f_i представлява константа на фрагмент, F_j е корекционен член, а a_i и b_j са съответните честоти на срещане. Списъци от стойности за фрагменти, представляващи атоми или групи, както и списъци с корекционни членове F_j , са изведени от експериментални стойности на P_{ow} чрез опити и грешки. Корекционните членове са разделени в няколко различни класа (1)(4). За вземане под внимание на всички правила и корекционни членове са разработени софтуерни пакети (3).

КОМБИНИРАН МЕТОД

8. Изчисляването на $\log P_{ow}$ за сложни молекули може значително да се подобри, ако молекулата се раздели на по-големи подструктури, за които са налични надеждни стойности на $\log P_{ow}$ от таблици (3)(4), или от съществуващи измервания. Такива фрагменти (например хетероцикли, антрахинон, азобензен) могат впоследствие да се комбинират с π -стойностите на Ханш или с константите за фрагментите на Рекер или Лео.

Забележки

- i) Изчислителните методи са приложими само за частично или напълно йонизирани вещества, когато са взети предвид необходимите корекционни фактори.
- ii) Ако може да се предположи наличието на вътрешномолекулни водородни връзки, трябва да се прибавят съответните корекционни членове (приблизително от + 0,6 до + 1,0 $\log P_{ow}$ единици) (1). Данни за наличието на такива връзки могат да се получат от пространствени модели или от спектроскопски данни.
- iii) Ако са възможни няколко тавтомерни форми, за основа на изчисленията се взема най-вероятната форма.
- iv) Внимателно трябва да се следят измененията, внасяни в списъците от константи на фрагментите.

ЛИТЕРАТУРА ОТНОСНО ИЗЧИСЛИТЕЛНИТЕ МЕТОДИ

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).
- (2) W.J. Dunn, J.H. Block and R.S. Pearlman (ed.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) and Oxford (1986).
- (3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).
- (4) C. Hansch and A.J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).

▼M6

- (5) Leo, C. Hansch and D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical. Reviews.* 71, 525.
- (6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther.* 14, 479.
- (7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 5175.
- (8) R.F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochimistry Library, Vol. 1, Elsevier, New York (1977).
- (9) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere.* 12, 1459.
- (10) R.A. Scherrer. ACS — Symposium Series 255, p. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).

▼ **M7****A.25. ДИСОЦИАЦИОННИ КОНСТАНТИ ВЪВ ВОДА (ТИТРИМЕТРИЧЕН МЕТОД — СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕН МЕТОД — КОНДУКТOMETРИЧЕН МЕТОД)****ВЪВЕДЕНИЕ**

Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСР 112 (1981).

Предпоставки

- Подходящ метод за анализ
- Разтворимост във вода

Информация за насоки

- Структурна формула
- Електрическа проводимост за кондуктометричния метод

Отговаряне на изискванията

- Всички методи за изпитване могат да се извършват с вещества с квалификация „чист“ или вещества с търговско качество. Възможното влияние на онечистванията върху резултатите следва да бъде взето предвид.
- Титриметричният метод не е подходящ за вещества с малка разтворимост (вж. „Разтвори за изпитване“ по-долу).
- Спектрофотометричният метод е приложим само за вещества, които имат осезаемо различни абсорбционни спектри в ултравиолетовата и видимата област (UV/VIS-абсорбционни спектри) за дисоциираните и недисоциираните форми. Настоящият метод може също да е подходящ за вещества с малка разтворимост и за дисоциации, различни от киселинно-основните, например комплексообразуване.
- В случаите, в които е валидно уравнението на Онсагер, може да се използва кондуктометричният метод, дори при умерено ниски концентрации, и дори в случай на равновесия, различни от киселинно-основните.

Стандартни документи

Настоящият метод за изпитване се основава на методите, посочени в позоваванията, изброени в раздел „Литература“ и на „Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification“ на Агенцията на САЩ за опазване на околната среда, 18 август 1978 г.

МЕТОД — ВЪВЕДЕНИЕ, ЦЕЛ, ОБХВАТ, ОТНОСИМОСТ, ПРИЛАГАНЕ И ГРАНИЦИ НА ИЗПИТВАНЕТО

Дисоциацията на дадено вещество във вода е от значение при оценката на неговото въздействие върху околната среда. Тя определя формата на веществото, която на свой ред определя неговото поведение и пренасяне. Тя може да повлияе върху адсорбцията на химикала в почвата и седиментите и адсорбцията в биологични клетки.

Определения и мерни единици

Дисоциация е обратимото разделяне на два или повече химични вида, които могат да бъдат йони. Процесът обичайно се означава като



а концентрационната равновесна константа, определяща реакцията, е

$$K = \frac{[R^+][X^-]}{[RX]}$$

Например в конкретния случай, в който R е водород (веществото е киселина), константата е

▼ **M7**

$$K_a = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

или

$$pK_a = pH - \log \frac{[X^-]}{[HX]}$$

Референтни вещества

Следните референтни вещества не е необходимо да се използват при всички случаи, когато се изследва ново вещество. Те се предоставят най-вече за извършване, от време на време, на калибриране на метода, и за даване на възможност за сравняване на резултатите, когато е приложен друг метод.

	pK _a (1)	Темп. в °C
<i>p</i> -Нитрофенол	7,15	25 (1)
Бензоена киселина	4,12	20
<i>p</i> -Хлороанилин	3,93	20

(1) Стойност за 20 °C не е налична, но може да се допусне, че варирането между резултатите от измерванията е по-високо от очакваната температурна зависимост

Би било от полза да има вещество с няколко рК, както е посочено в „Принцип на метода“ по-долу. Такова вещество може да бъде:

Лимонена киселина	pK _a (8)	Темп. в °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Принцип на метода за изпитване

Описаниеят химичен процес като цяло е само слабо зависим от температурата в температурния обхват, относим към околната среда. Определянето на стойността на дисоциационната константа изисква измерване на концентрациите на дисоциираните и недисоциираните форми на химичното вещество. От познанията за стехиометрията на дисоциационната реакция, посочена по-горе в „Определения и мерни единици“, може да бъде определена съответната константа. В конкретния случай, описан в настоящия метод за изпитване, вещество реагира като киселина или основа, и най-подходящият начин за определянето е чрез определяне на относителните концентрации на йонизираните и нейонизираните форми на веществото и рН на разтвора. Връзката между тези термини е дадена в уравнението за рК_a по-горе в „Определения и мерни единици“. Някои вещества са с повече от една дисоциационна константа и могат да бъдат разработени сходни уравнения. Някои от методите, описани тук, също са подходящи за дисоциации, различни от киселинно-основните.

Критерии за качество*Повторяемост*

Определянето на дисоциационната константа трябва да се извърши с повторения (минимум три определяния) в рамките на ± 0,1 log единици.

ОПИСАНИЕ НА ПРОЦЕДУРИТЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

Съществуват два основни подхода при определянето на рК_a. Единият включва титруване на известно количество вещество със стандартна киселина или основа, според случая; Другият включва определяне на относителната концентрация на йонизираните и нейонизираните форми на веществото и нейната зависимост от рН.

▼ M7**Подготовка**

Методите, основани на тези принципи, могат да бъдат класифицирани като титриметрични, спектрофотометрични и кондуктометрични процедури.

Разтвори за изпитване

При титриметричния и при кондуктометричния метод химичното вещество следва да се разтвори в дестилирана вода. При спектрофотометричния и при други методи се използват буферни разтвори. Концентрацията на изпитваното вещество не трябва да надвишава по-ниската от стойностите 0,01 М или половината от концентрацията на насищане, а при приготвянето на разтворите следва да бъде използвана формата на веществото с възможно най-голямата степен на чистота. Ако веществото е само умерено разтворимо, преди добавянето към концентрациите, посочени по-горе, то може да се разтвори в малко количество разтворител, който може да се смесва с вода.

Разтворите следва да бъдат проверени за наличието на емулсии, като се използва сноп за Гиндалов ефект, особено ако се използва съразтворител за повишаване на разтворимостта. Когато се използват буферни разтвори, концентрацията на буфера не трябва да превишава 0,05 М.

Условия на изпитването*Температура*

Температурата следва да се контролира до най-малко $\pm 1^\circ\text{C}$. Определянето следва да се осъществява за предпочитане при 20°C .

Ако се очаква значима зависимост от температурата, определянето трябва да се проведе поне при две други различни температури. Температурните интервали трябва да бъдат 10°C в този случай, а температурният контрол $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

Анализи

Методът се определя в зависимост от природата на изпитваното вещество. Той трябва да е с достатъчна чувствителност, позволяваща определянето на различните химични видове при всяка концентрация на изпитвания разтвор.

Провеждане на изпитването*Титриметричен метод*

Изпитваният разтвор се определя чрез титруване със стандартен разтвор на основа или киселина, както е уместно, като се измерва рН след всяко добавяне на титрант. Преди еквивалентния пункт следва да бъдат направени най-малко 10 последователни добавяния. Ако равновесието се достига достатъчно бързо, може да бъде използван записващ потенциометър. За този метод трябва да бъдат точно известни както общото количество вещество, така и неговата концентрация. Трябва да се вземат предпазни мерки, за да се изключи въглеродният диоксид. Подробности за процедурата, предпазните мерки и изчисленията са дадени в стандартните изпитвания, напр. препратки (1), (2), (3), (4).

Спектрофотометричен метод

Намира се дължина на вълната, при която йонизираната и нейонизираната форма на веществото имат осезаемо различни коефициенти на екстинкция. UV/VIS-абсорбционният спектър се получава от разтвори с постоянна концентрация при стойности на рН, при които веществото по същество остава нейонизирано и напълно йонизирано при няколко междинни стойности на рН. Това може да се направи или като се добавя на порции концентрирана киселина (основа) към относително голям обем от разтвор на веществото в многокомпонентен буфер, първоначално при високи (ниски) стойности на рН (препаратка 5), или чрез добавяне на равни обеми изходен разтвор на веществото, например във вода или метанол, към постоянни обеми на различни буферни разтвори, които покриват желания обхват от стойности на рН. От стойностите на рН и на абсорбцията при избраната дължина на вълната се изчислява достатъчен брой стойности за rK_a , като се използват данни най-малко при 5 стойности на рН, при които веществото е йонизирано най-малко 10 процента и по-малко от 90 процента. Допълнителни експериментални данни и методи за изчисление са дадени в препаратка (1).

▼ **M7***Кондуктометричен метод*

Като се използва клетка с предварително известна малка константа на клетката, се определя проводимостта на приблизително 0,1 М разтвор на веществото във вода за измерване на електрическата проводимост. Измерват се също и проводимостите на няколко внимателно извършени разреждания на този разтвор. Концентрацията се намалява наполовина всеки път, като поредицата трябва да обхваща най-малко един порядък на концентрацията. Граничната проводимост при безкрайно разреждане се намира чрез извършване на подобен опит с натриевата сол и екстраполиране. Степента на дисоциация може да се изчисли от проводимостта на всеки разтвор с помощта на уравнението на Онсагер, и следователно с помощта на закона на Оствалд за разреждането дисоциационната константа може да бъде изчислена като $K = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$, където C е концентрацията в молове на литър, а α е дисоциираната фракция. Трябва да се вземат предпазни мерки, за да се изключи CO_2 . Допълнителни експериментални данни и методи за изчисление са дадени в текстове на стандарти и препратки (1), (6) и (7).

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Обработка на резултатите***Титриметричен метод*

Изчислява се pK_a за 10 измерени точки от титрувалната крива. Изчисляват се средната стойност и стандартното отклонение за такива стойности на pK_a . Следва да бъде включена графика на pH спрямо обема стандартна основа или киселина, заедно с таблично представяне.

Спектрофотометрични методи

Абсорбцията и pH за всеки спектър се представят в табличен вид. От точките с данни за междинните спектри се изчисляват най-малко пет стойности за pK_a , изчисляват се също и средната стойност и стандартното отклонение за тези резултати.

Кондуктометричен метод

Еквивалентната проводимост Λ се изчислява за всяка концентрация на киселина и за всяка концентрация на смес от един еквивалент киселина, плюс 0,98 еквивалент на несъдържащ карбонати натриев хидроксид. Киселината е в излишък, за да се избегне наличието на излишък на OH^- поради хидролиза. $1/\Lambda$ се нанася на графика спрямо \sqrt{C} и Λ_0 на солта може да се намери чрез екстраполация до нулева концентрация.

Λ_0 на киселината може да бъде изчислено на база на данни от литературата за H^+ и Na^+ . Стойността на pK_a може да бъде изчислена от $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_0$ и $K_a = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$ за всяка концентрация. По-добри стойности за K_a могат да бъдат получени чрез корекции за мобилност и активност. Следва да се изчислят средната стойност и стандартното отклонение за стойностите на pK_a .

Протокол от изпитването

Следва да бъдат представени всички необработени данни и изчислени стойности на pK_a , заедно с метода за изчисление (за предпочитане в таблична форма, като например предложената в препратка (1) както и статистическите параметри, описани по-горе. За титриметричните методи следва да се представи подробна информация за стандартизацията на титрантите.

За спектрофотометричния метод следва да бъдат представени всички спектри. За кондуктометричния метод следва да се протоколира подробна информация за определянето на константата на клетката. Следва да бъде посочена информация за използваната техника, аналитичните методи и естеството на всички използвани буфери.

Следва да бъде(ат) протоколирана(и) температурата(ите) на изпитването.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Albert, A. & Seargent, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases*, Wiley, Inc., New York, 1962.

▼M7

- (2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, *Env. Sci. Tech.* 3, II, pp. 1186-1188 (1969).
- (3) ASTM D 1293 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
- (4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.
- (5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. *Chem. Ind. (London)* 281, (March 1973).
- (6) ASTM D 1125 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
- (7) Standard Method 205 — APHA/AWWA/NPCF (see above(4)).
- (8) *Handbook of Chemistry and Physics*, 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

▼B**ЧАСТ Б: МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТОКСИЧНОСТТА И
ДРУГИ ЕФЕКТИ ВЪРХУ ЗДРАВЕТО**

СЪДЪРЖАНИЕ

ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ

- Б.1А. ОСТРА ОРАЛНА ТОКСИЧНОСТ — ПРОЦЕДУРА С ФИКСИРАНИ ДОЗИ
- Б.1Б. ОСТРА ОРАЛНА ТОКСИЧНОСТ — МЕТОД КЛАС ОСТРА ТОКСИЧНОСТ
- Б.2. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ (ИНХАЛАТОРНА)
- Б.3. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ (ДЕРМАЛНА)
- Б.4. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ: КОЖНО ДРАЗНЕЩО/КОРОЗИВНО ДЕЙСТВИЕ
- Б.5. ОСТРО ДРАЗНЕЩО/КОРОЗИВНО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ ОЧИТЕ
- Б.6. КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ
- Б.7. 28-ДНЕВНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ОРАЛНАТА ТОКСИЧНОСТ ПРИ ГРИЗАЧИ С ПОВТАРЯЩА СЕ ДОЗА
- Б.8. СУБАКУТНА ИНХАЛАТОРНА ТОКСИЧНОСТ: 28-ДНЕВНО ИЗСЛЕДВАНЕ
- Б.9. ТОКСИЧНОСТ (ДЕРМАЛНА) С МНОГОКРАТНИ ДОЗИ (28 ДНИ)
- Б.10. ИЗПИТВАНЕ *IN VITRO* ЗА ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ ПРИ БОЗАЙНИЦИ
- Б.11. ИЗПИТВАНЕ ЗА ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ В КОСТЕН МОЗЪК НА БОЗАЙНИЦИ
- Б.12. ИЗПИТВАНЕ ЗА МИКРОЯДРА В ЕРИТРОЦИТИ НА БОЗАЙНИЦИ
- Б.13/14. МУТАГЕННОСТ — БАКТЕРИИ ЗА ТЕСТВАНЕ НА ОБРАТНИ МУТАЦИИ
- Б.17. МУТАГЕННОСТ — *IN VITRO* ТЕСТ ЗА КЛЕТЪЧНИ ГЕННИ МУТАЦИИ ПРИ БОЗАЙНИЦИ
- Б.21. ИЗПИТВАНЯ *IN VITRO* ЗА ТРАНСФОРМАЦИИ В КЛЕТКИ ОТ БОЗАЙНИЦИ
- Б.22. ИЗПИТВАНЕ ЗА ДОМИНАНТНА ЛЕТАЛНОСТ ПРИ ГРИЗАЧИ

▼B

- Б.23. ТЕСТ ЗА СПЕРМАТОГОНИАЛНИ ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ ПРИ БОЗАЙНИЦИ
- Б.25. НАСЛЕДСТВЕНИ ТРАНСЛОКАЦИИ ПРИ МИШКИ
- Б.26. ТЕСТВАНЕ НА СУБХРОНИЧНА ОРАЛНА ТОКСИЧНОСТ — 90-ДНЕВНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ТОКСИЧНОСТТА ПРИ ГРИЗАЧИТЕ С ПОВТАРЯЩА СЕ ДОЗА
- Б.27. ИЗСЛЕДВАНЕ НА СУБХРОНИЧНА ОРАЛНА ТОКСИЧНОСТ — 90-ДНЕВНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ТОКСИЧНОСТТА ПРИ НЕ ГРИЗАЧИ С ПОВТАРЯЩА СЕ ДОЗА
- Б.28. ИЗПИТВАНЕ ЗА СУБХРОНИЧНА ДЕРМАЛНА ТОКСИЧНОСТ — 90-ДНЕВНИ МНОГОКРАТНИ ДЕРМАЛНИ ДОЗИ ПРИ ГРИЗАЧИ
- Б.29. СУБХРОНИЧНА ИНХАЛАТОРНА ТОКСИЧНОСТ: 90-ДНЕВНО ИЗСЛЕДВАНЕ
- Б.30. ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ХРОНИЧНА ТОКСИЧНОСТ
- Б.31. ИЗПИТВАНЕ ЗА ОЦЕНКА НА ТОКСИЧНОСТТА ЗА ПРЕНАТАЛНОТО РАЗВИТИЕ
- Б.32. ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА КАНЦЕРОГЕННОСТ
- Б.33. КОМБИНИРАНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА ХРОНИЧНА ТОКСИЧНОСТ/КАНЦЕРОГЕННОСТ
- Б.34. ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ЗА РАЗМНОЖАВАНЕТО В ЕДНО ПОКОЛЕНИЕ
- Б.35. ИЗПИТВАНЕ ЗА РЕПРОДУКТИВНА ТОКСИЧНОСТ В ДВЕ ПОКОЛЕНИЯ
- Б.36. ТОКСИКОКИНЕТИКА
- Б.37. ЗАБАВЕНА НЕВРОТОКСИЧНОСТ КЪМ ОРГАНИЧНИ ФОСФОРСЪДЪРЖАЩИ ВЕЩЕСТВА СЛЕД ОСТРО ИЗЛАГАНЕ
- Б.38. ЗАБАВЕНА НЕВРОТОКСИЧНОСТ КЪМ ОРГАНИЧНИ ФОСФОРСЪДЪРЖАЩИ ВЕЩЕСТВА НА 28-ИЯ ДЕН В ПРОУЧВАНЕ ЗА ПОВТАРЯЩА СЕ ДОЗА
- Б.39. ИЗПИТВАНЕ ЗА НЕРЕПАРАТИВЕН СИНТЕЗ НА ДНК (НСД) С ЧЕРНОДРОБНИ КЛЕТКИ ОТ БОЗАЙНИЦИ *IN VIVO*
- Б.40. *IN VITRO* КОЖНА КОРОЗИЯ: ТРАНСКУТАННО ИЗМЕРВАНЕ НА ЕЛЕКТРИЧЕСКОТО СЪПРОТИВЛЕНИЕ НА КОЖАТА (TER)
- Б.40А. *IN VITRO* КОЖНА КОРОЗИЯ: ИЗПИТВАНЕ ВЪРХУ МОДЕЛ НА ЧОВЕШКА КОЖА
- Б.41. *IN VITRO* ЗТЗ NRU ИЗПИТВАНЕ ЗА ФОТОТОКСИЧНОСТ
- Б.42. КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛОКАЛНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ

▼B

- Б.43. НЕВРОТОКСИКОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ ПРИ ГРИЗАЧИ
- Б.44. КОЖНА АБСОРБЦИЯ: *IN VITRO* МЕТОД
- Б.45. КОЖНА АБСОРБЦИЯ: *IN VIVO* МЕТОД
- Б.46. *IN VITRO* КОЖНО ДРАЗНЕНЕ: МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ ВЪРХУ РЕКОНСТРУИРАН ЧОВЕШКИ ЕПИДЕРМИС
- Б.47. МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ НА НЕПРОЗРАЧНОСТ И ПРОПУСКЛИВОСТ НА ГОВЕЖДАТА РОГОВИЦА ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА I) ХИМИКАЛИ, ПРЕД-ИЗВИКВАЩИ СЕРИОЗНО УВРЕЖДАНЕ НА ОЧИТЕ, И II) ХИМИКАЛИ, КОИТО НЕ ИЗИСКВАТ КЛАСИФИЦИРАНЕ ЗА ДРАЗНЕНЕ НА ОЧИТЕ ИЛИ СЕРИОЗНО УВРЕЖДАНЕ НА ОЧИТЕ
- Б.48. МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ С ИЗОЛИРАНИ ПТИЧИ ОЧИ ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА I) ХИМИКАЛИ, ПРЕД-ИЗВИКВАЩИ СЕРИОЗНО УВРЕЖДАНЕ НА ОЧИТЕ, И II) ХИМИКАЛИ, КОИТО НЕ ИЗИСКВАТ КЛАСИФИЦИРАНЕ ЗА ДРАЗНЕНЕ НА ОЧИТЕ ИЛИ СЕРИОЗНО УВРЕЖДАНЕ НА ОЧИТЕ
- Б.49. ИЗПИТВАНЕ *IN VITRO* ЗА МИКРОЯДРА В КЛЕТКИ ОТ БОЗАЙНИЦИ
- Б.50. КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛОКАЛНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ: DA
- Б.51. КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛОКАЛНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ: BRDU-ELISA
- Б.52. ОСТРА ИНХАЛАТОРНА ТОКСИЧНОСТ — МЕТОД КЛАС ОСТРА ТОКСИЧНОСТ
- Б.53. ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА НЕВРОТОКСИЧНОСТ ЗА РАЗВИВАЩИЯ СЕ ОРГАНИЗЪМ
- Б.54. УТЕРОТРОФИЧНО БИОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ ПРИ ГРИЗАЧИ: КРАТКОСРОЧНО СКРИНИНГОВО ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ЕСТРОГЕННИ СВОЙСТВА
- Б.55. БИОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА HERSHBERGER ПРИ ПЛЪХОВЕ: КРАТКОСРОЧНО СКРИНИНГОВО ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА (АНТИ)АНДРОГЕННИ СВОЙСТВА
- Б.56. РАЗШИРЕНО ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ЗА РЕПРОДУКЦИЯТА В ЕДНО ПОКОЛЕНИЕ
- Б.57. ИЗСЛЕДВАНЕ НА СТЕРОИДОГЕНЕЗАТА В H295R КЛЕТКИ
- Б.58. ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА ГЕННИ МУТАЦИИ В СОМАТИЧНИ И ЗАРОДИШНИ КЛЕТКИ ПРИ ТРАНСГЕННИ ГРИЗАЧИ
- Б.59. *IN CHEMICO* КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ДИРЕКТНА РЕАКЦИОННА СПОСОБНОСТ СПРЯМО ПЕПТИДИ (DPRA)
- Б.60. *IN VITRO* КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ ARE-NRF2 ЛУЦИФЕРАЗА
- Б.61. МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ С ПРОПУСКАНЕ НА ФЛУОРЕСЦЕИН ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ХИМИКАЛИ С КОРОЗИВНО И СИЛНО ДРАЗНЕЩО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ ОЧИТЕ
- Б.62. *IN VIVO* КОМЕТНО ИЗСЛЕДВАНЕ В АЛКАЛНА СРЕДА ВЪРХУ БОЗАЙНИЦИ



ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ

А. ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПРОУЧВАНОТО ВЕЩЕСТВО

Преди началото на всяко едно проучване на токсичност следва да се знае съставът на проучваното вещество, включително основните примеси, както и съответстващите физикохимични свойства, включително стабилност.

Физикохимичните свойства на проучваното вещество предоставят важна информация за избор на пътя на прилагане на веществото, за проектиране на всяко отделно проучване, както и за начина на работа и съхранение на проучваното вещество.

Създаването на аналитичен метод за количествено и качествено определяне на проучваното вещество (включително основните примеси, при възможност) в средата за дозиране, както и в биологичния материал, следва да предхожда началото на проучването.

Цялата информация, отнасяща се до идентифицирането, физикохимичните свойства, чистотата и поведението на проучваното вещество, следва да бъде включена в доклада за теста.

Б. ГРИЖИ ЗА ЖИВОТНИТЕ

Строгий контрол на условията на заобикалящата среда и техниката за добри грижи към животните са основни изисквания за тестовите върху токсичност.

і) *Условия на отглеждане*

Условията на средата в стаите или определените места на експерименталните животни следва да бъдат подходящи за проучваните видове. Подходящи условия за плъхове, мишки и морски свинчета са стайна температура – $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ при относителна влажност от 30 до 70 %; за зайците температурата следва да бъде $20 + 3^{\circ}\text{C}$ при относителна влажност от 30 до 70 %.

Някои експериментални техники са особено чувствителни към температурните ефекти, ето защо в такива случаи в описанието на тестовия метод се посочват всички подробности за подходящите условия. Във всички изследвания за токсични ефекти температурата и влажността следва да се мониторира, записват и включат в окончателния доклад на проучването.

Осветлението е изкуствено, последователността е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. Подробностите, свързани с начина на осветление, се записват и включват в окончателния доклад на проучването.

Ако няма други изисквания, специални за метода, животните могат да се отглеждат индивидуално или в клетки на малки групи от един и същи пол; при групово отглеждане не бива да има повече от пет животни в клетка.

В докладите за експериментални животни е важно да се посочат видът на клетката и броят на животните, обитаващи всяка една клетка, както по време на излагане на действието на химическото вещество, така и в последвалия период на наблюдение.

▼Bii) *Условия на хранене*

Диетата следва да отговаря на всички хранителни изисквания на видовете, участващи в теста. При прилагане на проучваните вещества в храната на животните хранителната стойност на последната може да бъде намалена поради взаимодействие между веществото и хранителните съставки. Възможността за такава реакция следва да се отчита при интерпретиране на резултатите от теста. Уместно е да се използват конвенционални лабораторни храни при неограничено количество вода за пиене. Изборът на храната се влияе от необходимостта да се осигури подходяща смес за проучваното вещество при прилаганата му по този метод.

Хранителните примеси, за които се знае, че влияят на токсичността, не бива да присъстват в интерфериращи концентрации.

В. АЛТЕРНАТИВНО ТЕСТВАНЕ

Европейският съюз се е ангажирал с насърчаване на развитието и узаконяването на алтернативни техники, които могат да предоставят същото ниво на информация, както и настоящите тестове с животни, но използват по-малко животни, причиняват по-малко страдание или изобщо избягват употребата на животни.

След като станат достъпни, тези методи трябва да се имат предвид винаги, когато е възможно, за характеризиране на риска и последваща класификация и етикетирание на съществени рискове.

Г. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

При оценка и интерпретация на тестовете следва да се има предвид границата на областта, до която резултатите от проучванията сред животни и *in vitro* могат да бъдат директно екстраполирани към човека. Ето защо данните за наличие на странични ефекти при хората, където ги има, могат да се използват за потвърждение на опитните резултати.

Д. ПРЕПРАТКИ

Повечето от тези методи са създадени в рамките на програмата на ОИСР за изработване на ръководство за тестове и следва да се прилагат в съгласие с принципите за добрата лабораторна практика, така че да се осигури възможно най-широко „взаимно приемане на данните“.

Допълнителна информация може да се намери в препратките на ръководството на ОИСР, както и в съответната литература, публикувана на други места.

▼B**Б.1А. ОСТРА ОРАЛНА ТОКСИЧНОСТ — ПРОЦЕДУРА С ФИКСИРАНИ ДОЗИ****1. МЕТОД**

Този метод за изпитване е еквивалентен на ОИСП TG 420 (2001).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

При традиционните методи за оценяване на остра токсичност като краен резултат се достига до смърт на използваните животни. През 1984 г. бе предложен нов подход за тестване на остра токсичност от Британското токсикологично дружество, основаващ се на определяне на поредица от нива с фиксирани дози (1). При този подход се избягва смъртта на животните в края на експериментите и се разчита изцяло на наблюдението за ясни признаци за токсичност във всяка поредица от нива с фиксирани дози. След направените в Обединеното кралство (2) и международните (3) изследвания *in vivo* за утвърждаване процедурата бе одобрена като метод за изпитване през 1992 г. Възможностите статистическите възможности на процедурата с фиксирани дози са оценени чрез използването на математически модели в поредица от изследвания (4) (5) (6). Едновременно, изследванията *in vivo* и тези чрез създаване на модели показват, че процедурата е репродуктивна, използва по-малко животни и причинява по-малко страдание от традиционните методи и дава възможност да се категоризират веществата по начин, подобен на този при другите методи за изпитване на остра токсичност.

Насоки за избор на най-подходящия метод за изследване с определена цел могат да бъдат намерени в Ръководството за провеждане на изследвания на остра орална токсичност (7). Това ръководство също съдържа допълнителна информация за провеждането и интерпретирането на метода за изследване Б.1А.

В този метод по принцип се използват само дози с умерена токсичност и следва да се избягва прилагането на дози, за които се очаква да са летални. Така също дози, за които е известно, че могат да причинят болка и страдание поради корозивни или силно дразнещи въздействия, не следва да бъдат прилагани. Умиращите животни или животните, очевидно изпитващи болка или показващи признаци на дълбоко и продължително страдание, се убиват по хуманен начин и се вземат предвид при интерпретирането на резултатите по същия начин, както животните, умрели по време на експеримента. Критериите за вземане на решение да бъде убито умиращо или дълбоко страдащо животно и насоките за разпознаване на предвидима или предстояща смърт са предмет на отделно ръководство (8).

Методът осигурява информация за опасните свойства и позволява веществото да бъде категоризирано и класифицирано съгласно Глобалната система за хармонизиране (GHS) на класификацията на химични вещества, които причиняват остра токсичност (9).

Лабораториите за изпитване следва да вземат предвид цялата налична информация за изпитваното вещество преди провеждане на експеримента. Такава информация включва идентичността и химичната структура на веществото; неговите физикохимични свойства; резултатите от всякакви други *in vitro* или *in vivo* токсикологични изпитвания на веществото; токсикологичните данни за структурно близки вещества и очакваната(ите) употреба(и) на веществото. Тази информация е необходима, за да се удостовери напълно, че това изпитване е свързано със защитата на човешкото здраве и ще бъде от полза при избора на подходяща начална доза.

▼B

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Остра орална токсичност: отнася се до онези вредни ефекти, които се появяват в резултат на орален прием на еднократна доза вещество или многократни дози, давани в рамките на 24 часа.

Бавна смърт означава, че животното не умира или не се проявяват признаци, че умира в рамките на 48 часа, но умира по-късно през 14-дневния период на наблюдение.

Доза е количеството на приетото вещество за тестване. Дозата се изразява като маса на тестваното вещество за единица тегло на изследваното животно (напр. mg/kg).

Доказана токсичност е общоприет термин, описващ ясните признаци на токсичност вследствие на приемане на изпитваното вещество (вж. (3) например), такива че при приемане на следваща най-висока фиксирана доза могат да бъдат очаквани всякакви признаци на дълбока болка и продължителни дълбоки страдания, терминално състояние (критериите са представени в Ръководството за хуманен край (8) или вероятна смърт на повечето животни.

GHS: Глобална система за хармонизиране на класификацията на химични вещества и смеси. Съвместна дейност на ОИСП (човешки здраве и околна среда), Комитета на ООН от експерти в областта на транспортирането на опасни стоки (физикохимични свойства) и МОТ (опасни комуникации) и координирана чрез Междурегистровата програма за правилно управление на химикалите (ИОМС).

Неизбежна смърт: когато животното умира или се очаква настъпването на смъртта преди следващото планирано време за наблюдение. Признаците, които показват това състояние при гризачите, могат да включват конвулсии, латерално положение, отпуснатост и треперене. (Вж. Ръководството за хуманен край (8) за повече подробности.)

LD₅₀ (средна летална доза) е статистически получена еднократна доза на вещество, за което може да се очаква, че ще причини смърт при 50 % от животните, когато бъде въведено в тях по орален път. Стойността LD₅₀ се изразява за определени периоди като масата на изпитваното вещество за единица тегло на изследваното животно (mg/kg).

Ограничена доза: отнася се до доза, при която има по-високо ограничаване при изследването (2 000 или 5 000 mg/kg).

Настъпване на смърт: оставане в терминално състояние или неспособност да оцелее, дори ако се приложи лечение. (Вж. Ръководството за хуманен край (8) за повече подробности.)

Предсказуема смърт: присъствие на клинични признаци, които показват, че ще настъпи смърт в един предстоящ период от време преди планирания край на експеримента, например: неспособност да се достигне вода или храна. (Вж. Ръководството за хуманен край (8) за повече подробности.)

▼B**1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ**

Групи животни от един и същ пол са дозирани чрез прилагане на поэтапна процедура чрез използване на фиксирани дози от 5, 50, 300 и 2 000 mg/kg (по изключение може да бъде приложена допълнителна фиксирана доза от 5 000 mg/kg, вижте точка 1.6.2). Нивото на началната доза е определено въз основа на зрителни изследвания, като се очаква дозата да предизвика някои признаци на токсичност, без да причинява дълбоки токсични ефекти или смърт. Клиничните признаци и условията, свързани с болка, страдание и неизбежна смърт, са подробно описани в отделно ръководство на ОИСР (8). Следващи групи животни могат да бъдат дозирани с по-високи или по-ниски фиксирани дози в зависимост от присъствието или отсъствието на признаци за отравяне или смърт. Тази процедура продължава до достигане на дозата, причиняваща доказана токсичност, или до тогава, докато бъде идентифицирана смъртта на животното или не се наблюдават ефекти при най-високата доза, или когато се появят смъртни случаи при най-ниската доза.

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ**1.4.1. Избор на животински видове**

Предпочитаният вид от групата на гризачите е плъх, въпреки че могат да бъдат използвани и други видове гризачи. Обикновено се използват животни от женски пол (7). Причината за това е, че изследванията в научната литература от конвенционални изпитвания на LD50 показват, че обикновено има малка разлика в междуполовата сетивност, но в случаите, при които се наблюдават различия, женските индивиди като цяло са малко по-чувствителни (10). Въпреки това, ако познанията за токсикологичните и токсикокинетичните свойства на структурно близки химикали показват, че има вероятност мъжките индивиди да са по-чувствителни от женските, тогава се използват екземпляри от този пол. Когато изпитването се провежда върху мъжки индивиди, трябва да бъде предоставено адекватно обяснение за това.

Обикновено в лабораторните опитни постановки следва да се използват здрави млади полово зрели животни. Женските индивиди следва да не са раждали и да не са бременни. Всяко животно, при започване на дозирането му, следва да бъде на възраст между 8 и 12 седмици и теглото му да попада в интервала $\pm 20\%$ от средното тегло на всички предварително дозирани животни.

1.4.2. Условия за отглеждане и хранене

Температурата в стаята на опитните животни следва да бъде 22 °C (± 3 °C). Въпреки че относителната влажност следва да бъде поне 30 % и е препоръчително тя да не надвишава 70 %, освен при почистване на стаята, целта е да се постигне 50—60 % относителна влажност. Светлината следва да бъде изкуствена, с редуващи се 12 часа светъл период, 12 часа тъмен период. За хранене могат да бъдат използвани конвенционалните лабораторни диети с неограничен достъп до питейна вода. Животните могат да бъдат групирани в клетките по доза, но броят на животните в клетка не трябва да възпрепятства точните наблюдения на всяко животно.

1.4.3. Подготовка на животните

Животните са произволно избрани, маркирани, за да е възможно индивидуалното им идентифициране, и поставени в клетките си поне 5 дни преди започване на дозирането, за да се аклиматизират към лабораторните условия.



1.4.4. Подготовка на дозите

Най-общо изпитваните вещества трябва да бъдат приемани в постоянен обем в обхвата на дозите, които се изпитват чрез вариране в концентрацията на дозирания препарат. Когато крайният продукт, който трябва да бъде изпитван, е под формата на течност или смес обаче, за последващата оценка на риска от това вещество може да бъде по-подходящо изпитваното вещество да се употребява неразредено, т.е. при постоянна концентрация, което е и изискване от страна на някои регулаторни органи. Във всеки случай, обемът на максималната доза за администриране не трябва да бъде завишаван. Максималният обем на течността, която може да бъде приета наведнъж, зависи от размера на изследваното животно. При гризачи обикновено обемът не надвишава 1 ml/100 g телесно тегло: обаче в случай на водни разтвори може да се приемат 2 ml/100 g телесно тегло. Във връзка с изготвянето на дозирани препарати се препоръчва, където е възможно, да се използва воден разтвор/суспензия/емулсия, следван първо от разтвор/суспензия/емулсия в масло (напр. царевично масло) и след това по възможност от разтвор при други разтворители. Трябва да се знаят токсикологичните характеристики на разтворителите, с изключение на водата. Дозите не трябва да бъдат приготвяни дълго време преди приемането им, освен когато е известно и доказано, че препаратът ще остане стабилен и в добро състояние през времето, в което ще бъде използван.

1.5. ПРОЦЕДУРА

1.5.1. Приемане на дозите

Изпитваното вещество се приема на еднократни дози, чрез изкуствено хранене, в стомашния тръбопровод или чрез подходяща интубационна канюла. При извънредни обстоятелства, при които приемането на еднократна доза не е възможно, дозата може да бъде давана на по-малки части през период, който не може да превишава 24 часа.

Преди дозирането животните следва да бъдат поставени на ограничен режим на хранене за известно време (напр. на плъховете не следва да се дава храна, а само вода през нощта преди експеримента; на мишките в продължение на 3—4 часа не следва да се дава храна, а само вода). След периода на „постене“ животните трябва да бъдат претеглени и изпитваното вещество – приложено. След като веществото бъде прието, може да не се дава храна в следващите 3—4 часа при плъховете или 1—2 часа при мишките. Когато дозата се приема на части, в определен период от време може да се наложи да се осигури храна и вода на животните в зависимост от продължителността на периода.

1.5.2. Зрително изследване

Целта на зрителното изследване е да подпомогне избора на подходящата начална доза за основното изследване. Изпитваното вещество се приема от отделните животни последователно по начина, показан на графичните алгоритми в приложение 1. Зрителното изследване приключва, когато може да бъде взето решение за първоначалната доза в основното изследване (или ако смъртта е настъпила при най-ниската фиксирана доза).

Началната доза за зрителното изследване се избира от нивата на фиксираната доза: 5, 50, 300 и 2 000 mg/kg. Като основа се взема дозата, при която се очаква проява на доказана токсичност, когато е възможно, на база доказателство от *in vivo* и *in vitro* данни за същия химикал или за структурно близки химикали. При липсата на такава информация началната доза е 300 mg/kg.

Следва да има поне 24-часов период между дозирането на всяко животно. Всички животни следва да бъдат наблюдавани поне 14 дни.



По изключение и само когато е оправдано от определени регулаторни нужди, може да бъде приложена допълнителна фиксирана доза с по-високо ниво 5 000 mg/kg (вж. приложение 3). По причини, свързани с хуманното отношение към животните, изследването на животни в категория 5 на GHS в обхвата 2 000—5 000 mg/kg е нежелателно и следва да се има предвид само когато съществува голяма вероятност резултатите от такова изследване да имат практическо значение за опазване здравето на хората или животните, или за околната среда.

В случаите, когато животното, изследвано при най-ниското ниво с фиксирана доза (5 mg/kg) при провеждане на зрителното изследване, умре, при нормалната процедура изследването приключва и веществото се отнася към категория 1 на GHS (както е показано в приложение 1). Обаче, ако се изисква последващо потвърждаване на класифицирането, може да се предвиди евентуална допълнителна процедура, както следва. Второ животно се дозира с 5 mg/kg. Ако и второто животно умре, тогава категория 1 в GHS се потвърждава и изследването незабавно се прекратява. Ако второто животно оцеее, тогава максимум три допълнителни животни биват дозирани с по 5 mg/kg. Тъй като ще съществува висок риск от смъртност, тези животни следва да бъдат дозирани по начин, целящ опазване на хуманното отношение към животните. Времевият интервал между дозирането на всяко животно следва да бъде достатъчен, за да се установи, че предишното животно вероятно ще оцеее. Ако се установи втора смърт, дозирането следва да бъде незабавно преустановено и следващите животни не се дозират. Заради появата на втори смъртен случай (независимо от броя на изследваните животни в периода на приключването), попадащ в резултат А (два или повече смъртни случаи), следва правилото за класифициране на приложение 2 при 5 mg/kg фиксирана доза (категория 1, ако има два или повече смъртни случаи или категория 2, ако няма повече от 1 смъртен случай). Освен това приложение 4 дава насоки за класифициране по системата на ЕС, докато бъде въведена новата система GHS.

1.5.3. Основно изпитване

1.5.3.1. Брой животни и нива на дозиране

След изпитване с началното ниво на дозиране действието, което трябва да се извърши, е показано чрез графичния алгоритъм в приложение 2. Изисква изпълнението на едно от следните действия: да се прекрати всяко изпитване и да се определи, след класифициране, подходящият клас на опасност; да се проведе изпитване при по-висока фиксирана доза или изпитване при по-ниска фиксирана доза. Въпреки това, за защита на животните, нивото на дозата, причинила смърт при зрителното изследване, не се повтаря при основното изследване (вж. приложение 2). Опитът показва, че най-вероятният резултат при нивото на началната доза е, че веществото може да бъде класифицирано и не е необходимо по-нататъшно изследване.

Обикновено се използват общо пет животни от един и същ пол при всяко изследвано ниво на дозата. Едно от петте животни, което е било използвано при зрителното изследване, се дозира заедно с четирите останали животни (освен, по изключение, ако използваното ниво на дозата при основното изследване не е било включено в зрителното изследване).

Интервалът от време между дозирането на всяко ниво се определя от началото, продължителността и остротата на токсичните признаци. Третирането на животните със следваща доза следва да бъде забавено, докато се докаже, че животните, приели определената доза по-рано, ще оцелеят. Препоръчва се да има период от 3 или 4 дни между дозирането на всяко ниво, ако е нужно, за да има възможност за наблюдения върху забавената токсичност. При необходимост времевият интервал може да бъде регулиран, напр. в случай на незавършен отговор.

▼B

Когато се обмисля прилагането на по-високата фиксирана доза 5 000 mg/kg, се следва процедурата, представена в приложение 3 (вж. също точка 1.6.2).

1.5.3.2. Ограничено изпитване

Ограниченото изпитване се използва предимно в случаите, при които експериментаторът разполага с информация, съгласно която изпитваният материал по всяка вероятност не е токсичен, т.е. проявява токсичност само над нормативно ограничените дози. Информация за токсичността на изпитвания материал може да бъде събрана от познания за подобни тествани съединения или подобни тествани смеси или продукти, като се вземат предвид идентичността и процентното съдържание на съединенията, за които е известно, че са токсикологически значими. В случаите, когато има малко или няма информация за токсичността на материала или когато се очаква изпитваният материал да бъде токсичен, трябва да бъде проведено основното изследване.

Прилага се нормалната процедура, като началната доза при зрително изследване е 2 000 mg/kg (или по изключение 5 000 mg/kg), последвана от дозиране на допълнителни четири животни на това ниво на ограниченото изпитване по това ръководство.

1.6. НАБЛЮДЕНИЯ

Животните се наблюдават индивидуално след поне еднократно дозиране през първите 30 минути, периодично през първите 24 часа, с повишено внимание през първите 4 часа и ежедневно след това, през общо 14-дневен период от време, освен когато е необходимо да бъдат извадени от експеримента и убити по хуманен начин по причини, свързани с хуманното отношение към животните, или когато са намерени мъртви. Продължителността на наблюдението обаче не следва да бъде строго фиксирана. Тя следва да се определя въз основа на токсичните реакции, началното време и продължителността на периода за възстановяване и може да бъде увеличена, когато се сметне за необходимо. Периодите от време, в които се появяват и изчезват признаците на токсичност, са важни, особено ако има тенденция токсичните признаци да бъдат забавени (11). Всички наблюдения систематично се записват, с отделни записи, направени за всяко животно.

Допълнителни изследвания са необходими, ако животните продължат да показват признаци на токсичност. Наблюденията следва да включват промените в кожата и козината, очите и лигавиците, и също респираторната, циркулационната, автономната и централната нервна система, соматомоторна активност и моделите на поведение. Следва да бъде обърнато внимание на наблюденията за треперене, конвулсии, слюноотделяне, диария, летаргия, сън и кома. Следва да бъдат взети предвид принципите и критериите, резюмирани в Ръководството за хуманен край (8). Животните, намерени в терминално състояние, и животните, показващи дълбока болка или трайни признаци на дълбоко страдание, следва да бъдат хуманно убити. Когато животните са убити по хуманни причини или са намерени мъртви, следва да бъде записано времето на смъртта им, колкото е възможно по-точно.

1.6.1. Телесно тегло

Индивидуалното тегло на животните следва да бъде измервано в кратък интервал от време преди приемането на изпитваното вещество и поне веднъж седмично след това. Промените в теглото следва да бъдат изчислявани и записвани. В края на експеримента оцелелите животни се претеглят и след това хуманно се убиват.

▼B**1.6.2. Патология**

Всички изследвани животни (включително умрелите по време на експеримента или извадените от експеримента животни по причини, свързани с хуманното отношение към животните) следва да бъдат подложени на цялостна аутопсия. Всички цялостни патологични изменения във всяко животно следва да бъдат записани. Микроскопските изследвания на органите показват доказателствата за цялостна патология при животните, оцелели 24 часа или повече след първоначалното дозиране, и също могат да допринесат за получаването на полезна информация.

2. ДАННИ

Следва да бъдат осигурени индивидуални данни за всяко животно. Освен това всички данни следва да бъдат обобщени в таблична форма, показваща броя на използваните животни във всяка от изследваните групи, броя на животните, проявяващи признаци за токсичност, броя на животните, намерени мъртви по време на изследването или убити по хуманни причини, времето на настъпване на смъртта на животинския индивид, описание и развитие във времето на токсичните ефекти и обратимостта им, както и заключенията от аутопсията.

3. ОТЧИТАНЕ**3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Протоколът от изпитването по целесъобразност трябва да включва следната информация:

Изпитвано вещество:

- физична форма, чистота и, където е подходящо, физико-химични свойства (включително изомеризация);
- данни за идентичността, включително CAS номер.

Разтворител (ако има такъв):

- обосноваване на избора на разтворител, ако е различен от вода.

Изследвани животни:

- използвани видове/породи;
- микробиологично състояние на животните, когато е известно;
- брой, възраст и пол на животните (включително, при необходимост, обосноваване използването на мъжки индивиди вместо женски);
- водоизточник, условия за отглеждане, диета и т.н.

Условия на експеримента:

- подробности за формулирането на изпитваното вещество, включително подробности за физичното състояние на приемания материал;
- подробности, свързани с приемането на изпитваното вещество, обеми на дозите и време на дозиране;
- подробности във връзка с качеството на храната и водата (включително вид/източник на диетата, водоизточник);
- обосновка на избора на началната доза.

▼B

Резултати:

- таблици/диаграми на получените данни и ниво на дозата за всяко животно (т.е. при които животното показва признаци на токсичност, включително смърт, природа, острота и продължителност на ефектите);
- таблици/диаграми на телесното тегло и на измененията в него;
- индивидуални тегла на животните в деня на дозиране, през седмични интервали след това и по време на смърт или убиване;
- дата и време на смъртта, ако умрат преди програмираното унищожаване;
- развитие във времето от първоначалното появяване на признаци за токсичност и дали са били обратими при всяко животно;
- заключения при аутопсията и хистопатологични заключения за всяко животно, ако има такива.

Дискусия и интерпретиране на резултатите.

Заклечения.

4.

ПРЕПРАТКИ

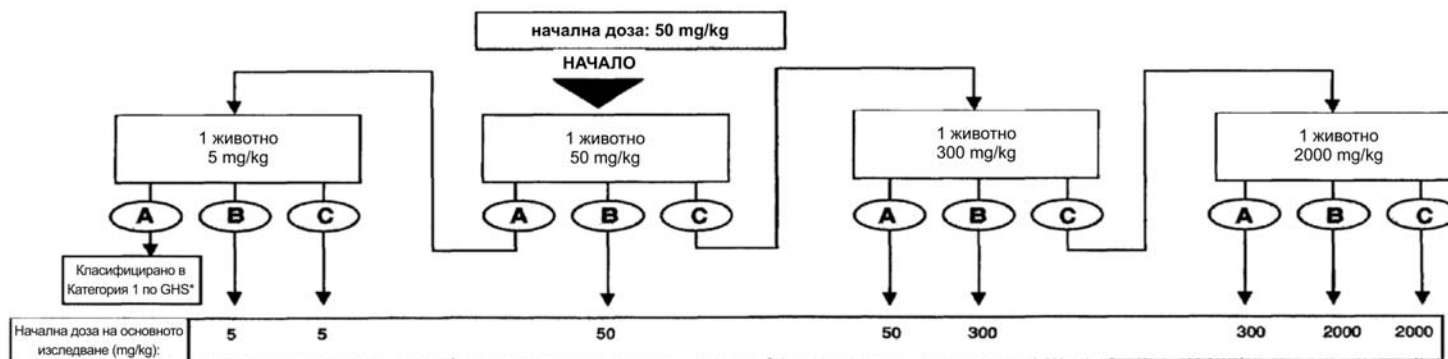
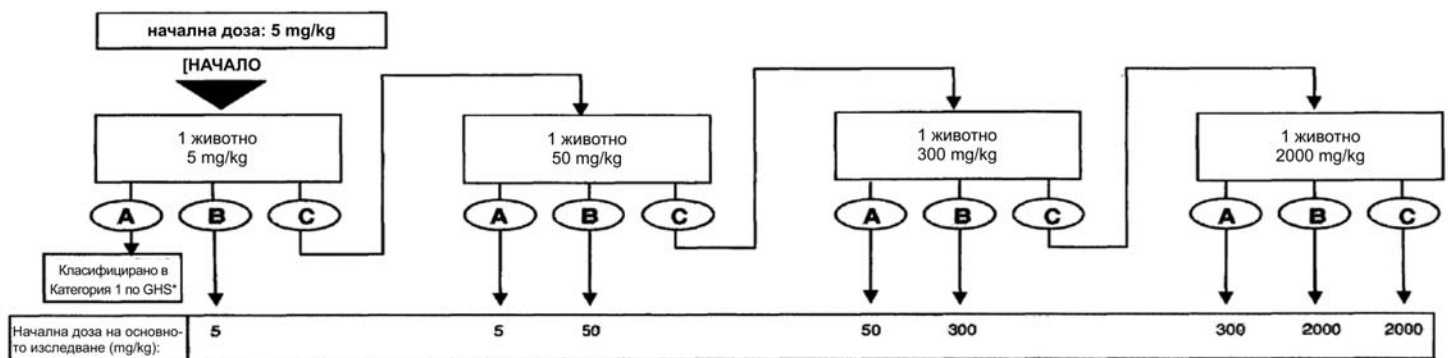
- (1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 3, 85—92.
- (2) Van den Heuvel, M. J., Dayan, A. D. and Shillaker, R. O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 6, 279—291.
- (3) Van den Heuvel, M. J., Clark, D. G., Fielder, R. J., Koundakjian, P. P., Oliver, G. J. A., Pelling, D., Tomlinson, N. J. and Walker, A. P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD₅₀ test. *Fd. Chem. Toxicol.* 28, 469—482.
- (4) Whitehead, A. and Curnow, R. N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 313—324.
- (5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol.* 14, 315—323. *Human Exptl. Toxicol.*
- (6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. *Hum. Exp. Toxicol.*, 21, 183—196.
- (7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

▼B

- (9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-№-24-№-0,FF.html>].
- (10) Lipnick, R. L., Cotruvo, J. A., Hill, R. N., Bruce, R. D., Stitzel, K. A., Walker, A. P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J. A. and Myers, R. C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD₅₀, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* 33, 223—231.
- (11) Chan P. K and A. W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: *Principles and Methods of Toxicology*. 3rd Edition. A. W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ГРАФИЧЕН АЛГОРИТЪМ ЗА ЗРИТЕЛНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ



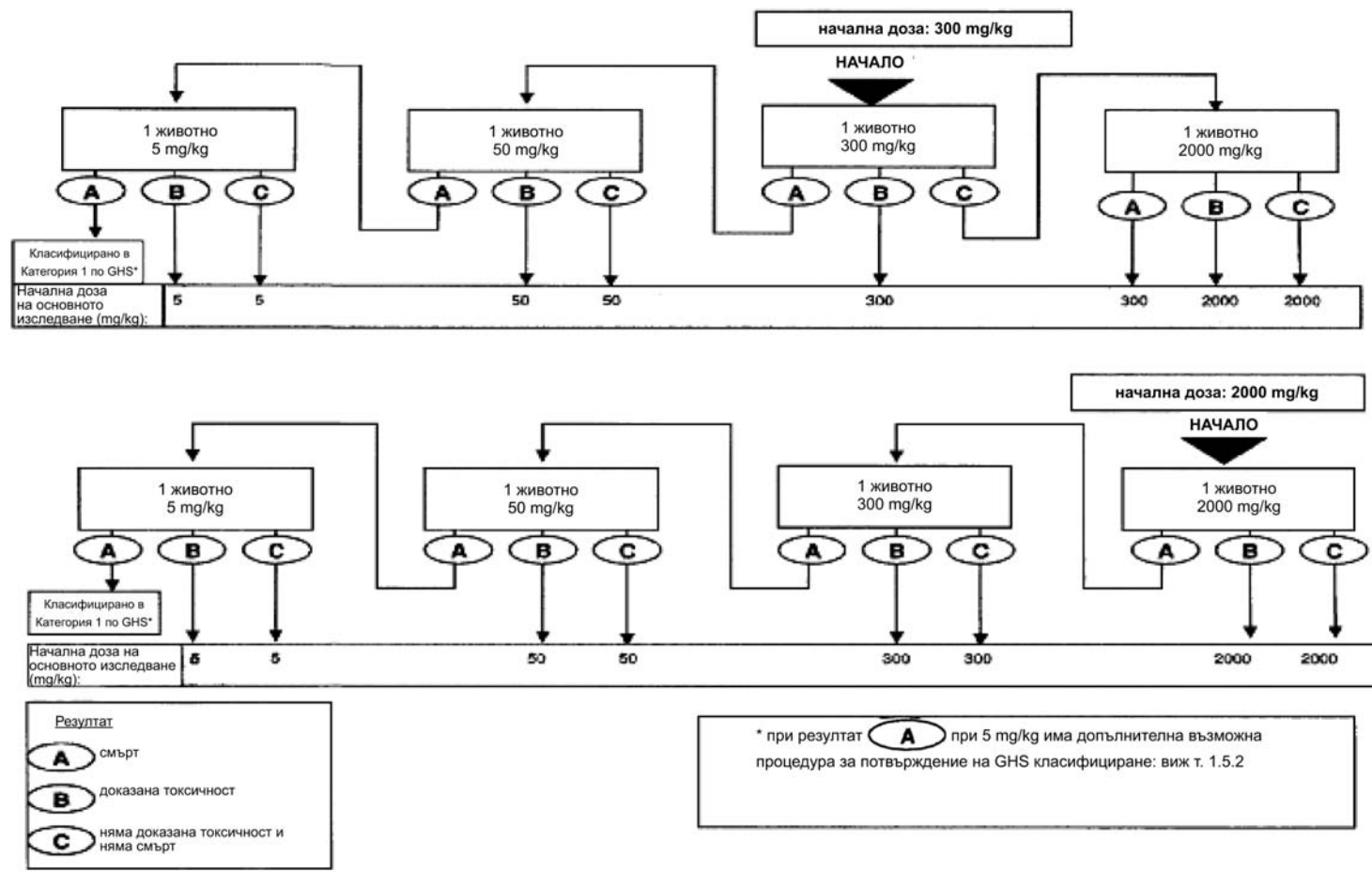
Резултат:

А смърт

В доказана токсичност

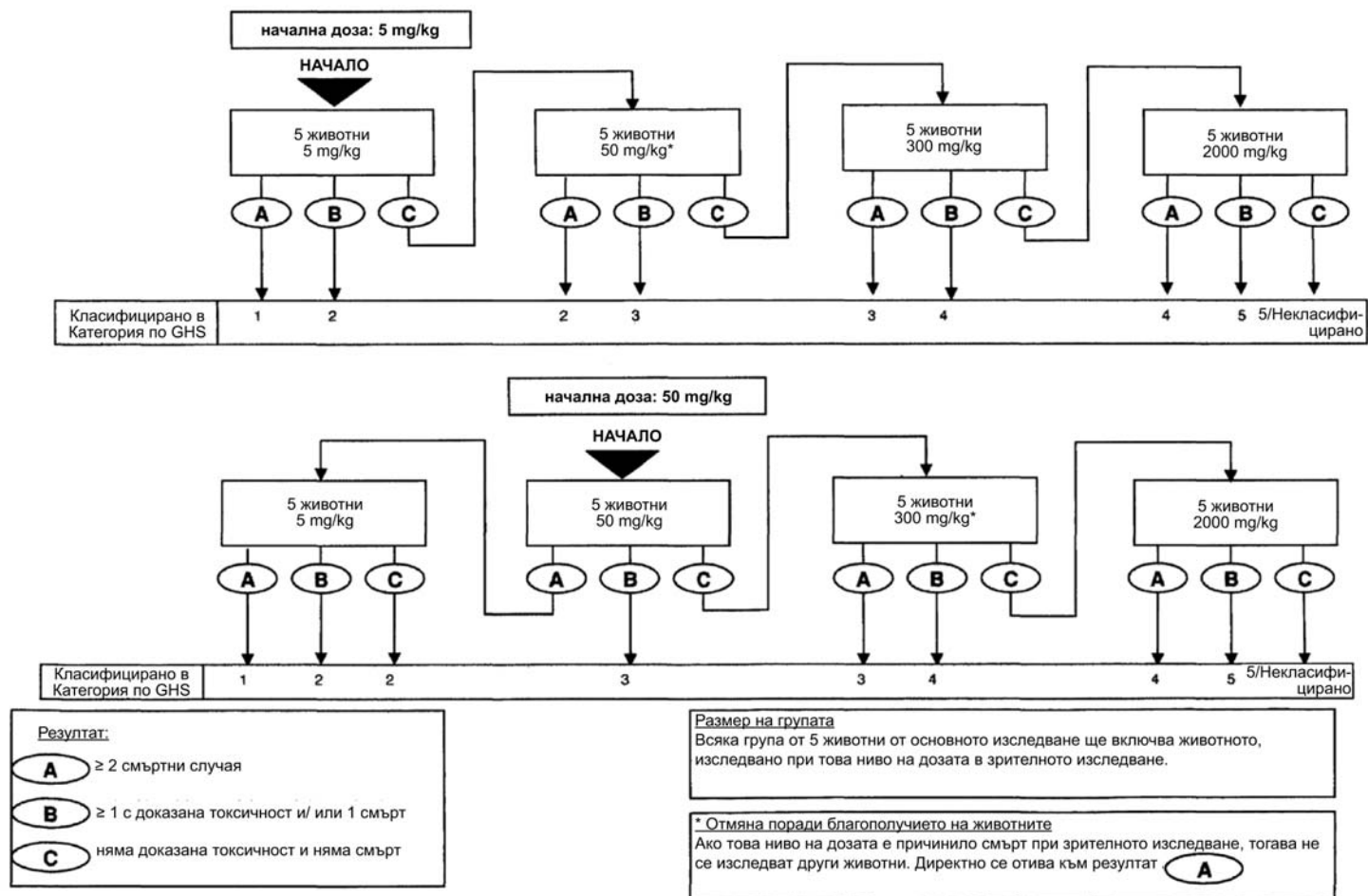
С няма доказана токсичност и няма смърт

*при резултат А при 5 mg/kg има допълнителна възможна процедура за потвърждение на GHS класифициране: виж т. 1.5.2

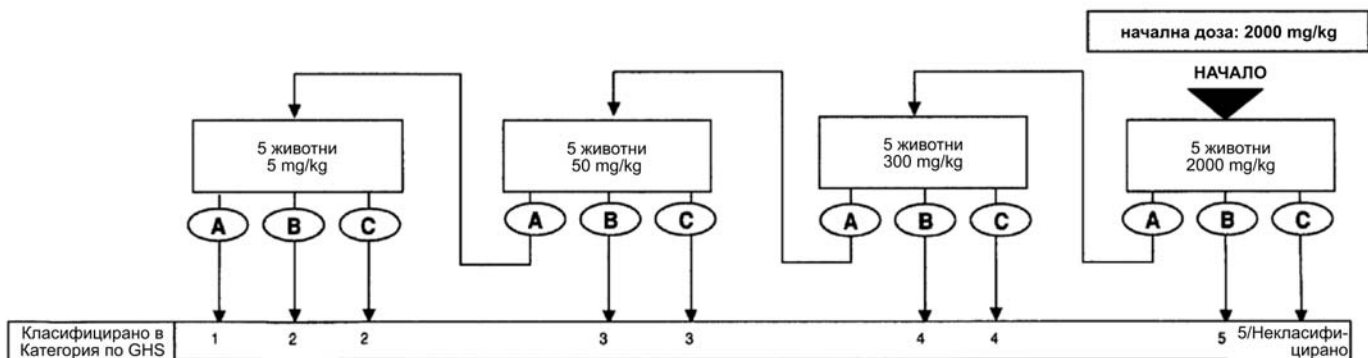
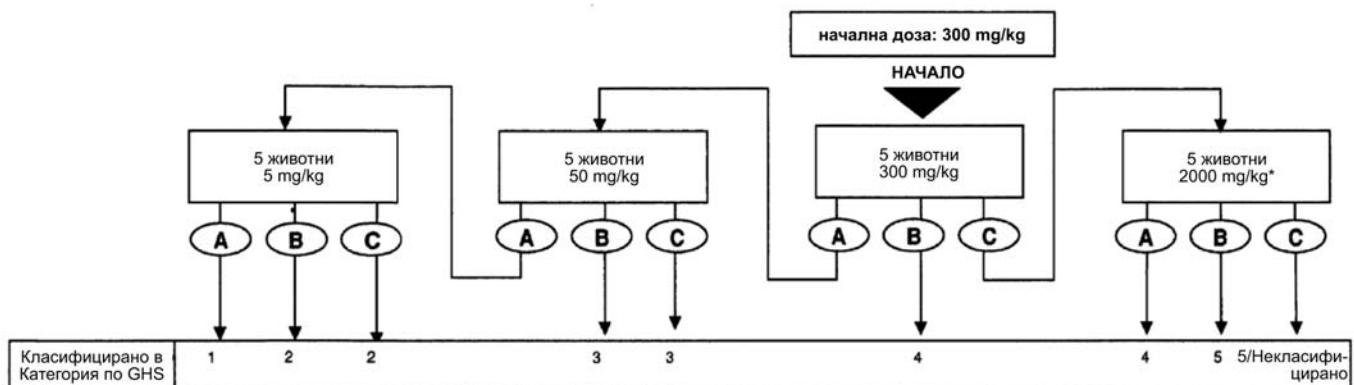


ПРИЛОЖЕНИЕ 2:

ГРАФИЧЕН АЛГОРИТЪМ ЗА ОСНОВНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ



▼B



Резултат:

A ≥ 2 смъртни случая

B ≥ 1 с доказана токсичност и/ или 1 смърт

C няма доказана токсичност и няма смърт

Размер на групата

Всяка група от 5 животни от основното изследване ще включва животното, изследвано при това ниво на дозата в зрителното изследване

* Отмяна поради благополучието на животните

Ако това ниво на дозата е причинило смърт при зрителното изследване, тогава не се изследват други животни. Директно се отива към резултат **A**.



ПРИЛОЖЕНИЕ 3

КРИТЕРИИ ЗА КЛАСИФИЦИРАНЕ НА ИЗПИТВАНО ВЕЩЕСТВО С ОЧАКВАНА СТОЙНОСТ НА LD₅₀ НАД 2 000 MG/KG БЕЗ НЕОБХОДИМОСТ ОТ ИЗПИТВАНЕ

Критериите за опасност в категория 5 се предназначени да подпомогнат идентифицирането на изпитваните вещества, които са с относително ниска опасност от остра токсичност, но които при определени обстоятелства могат да представляват опасност за уязвимите поколения. Тези вещества се очаква да имат орална или дермална LD₅₀ в обхвата 2 000—5 000 mg/kg или еквивалентни дози при други начини на приемане. Изпитваните вещества могат да бъдат класифицирани в категория на опасност, определена чрез: 2 000 mg/kg < LD₅₀ < 5 000 mg/kg (категория 5 в GHS) в следните случаи:

- а) ако са стигнали до тази категория по някоя от схемите за изследване от приложение 2, основани на смъртни инциденти;
- б) ако вече съществува достоверно доказателство, което показва, че LD₅₀ е в обхвата от стойности на категория 5, или други изследвания върху животни, или токсикологични изследвания върху хора дават основания за сериозно безпокойство относно човешкото здраве;
- в) чрез данни от екстраполация, оценяване или измерване, ако няма основание да се отнесе към по-висок клас на опасност, и

— има налична достоверна информация, показваща значителни токсикологични ефекти при хората, или

— наблюдава се смъртност при изпитване с високи стойности като тези в категория 4 чрез орален път на приемане, или

— когато експертната оценка потвърди съществените клинични признаци на токсичност при изпитване с високи стойности като тези в категория 4, освен при диария, пилоерекция или недобър външен вид, или

— когато експертната оценка потвърди достоверната информация, която индикира потенциална възможност за значими остри ефекти от други изпитвания върху животни.

ИЗСЛЕДВАНЕ С ДОЗИ НАД 2 000 MG/KG

По изключение и само когато е оправдано от определена необходимост за регулиране, може да се проведе изследване с използване на допълнителна по-висока фиксирана доза с ниво 5 000 mg/kg. Приемайки необходимостта от хуманно отношение към животните, не се препоръчва изследване с 5 000 mg/kg и следва да бъде взето предвид само, когато има голяма вероятност резултатите от такова изследване да имат пряко практическо значение за опазване здравето на хората или животните (9).

Зрително изследване

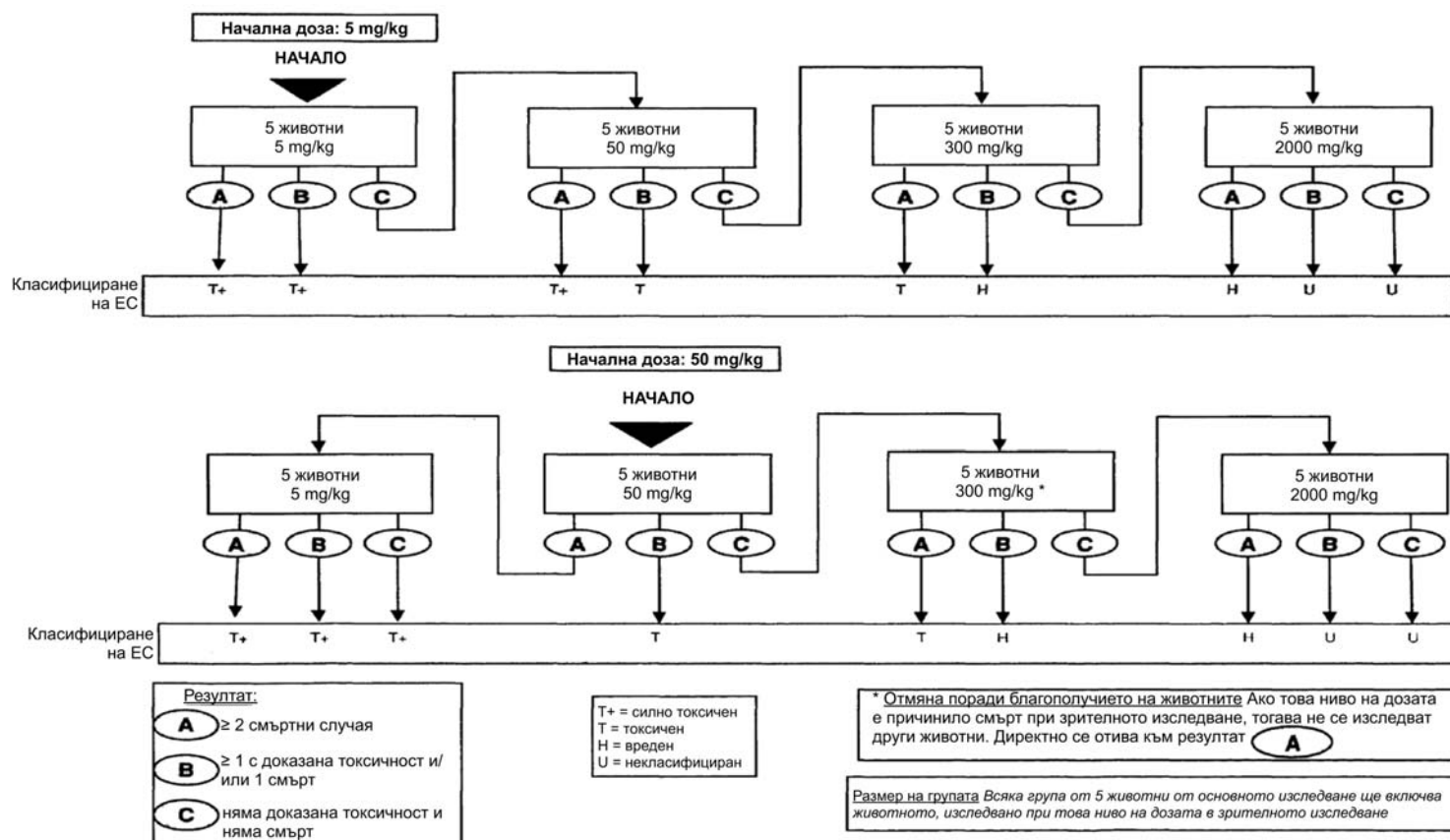
Правилата за вземане на решение, които са указани в следващата процедура, представена в приложение 1, включват доза с ниво 5 000 mg/kg. По този начин, когато при зрително изследване се използва начална доза 5 000 mg/kg и резултатът е А (смърт), се налага второто животно да бъде изследвано с 2 000 mg/kg; резултати В и С (доказана токсичност или нетоксичност) позволяват като начална доза за основното изследване да бъде избрана 5 000 mg/kg. По подобен начин, ако се използва начална доза, различна от 5 000 mg/kg, тогава изпитването ще доведе до прилагане на 5 000 mg/kg в случай на резултат В или С при 2 000 mg/kg; резултат А след прилагането на 5 000 mg/kg налага началната доза за основното изследване да бъде 2 000 mg/kg, а резултати В и С налагат началната доза за основното изследване да бъде 5 000 mg/kg.

▼B**Основно изследване**

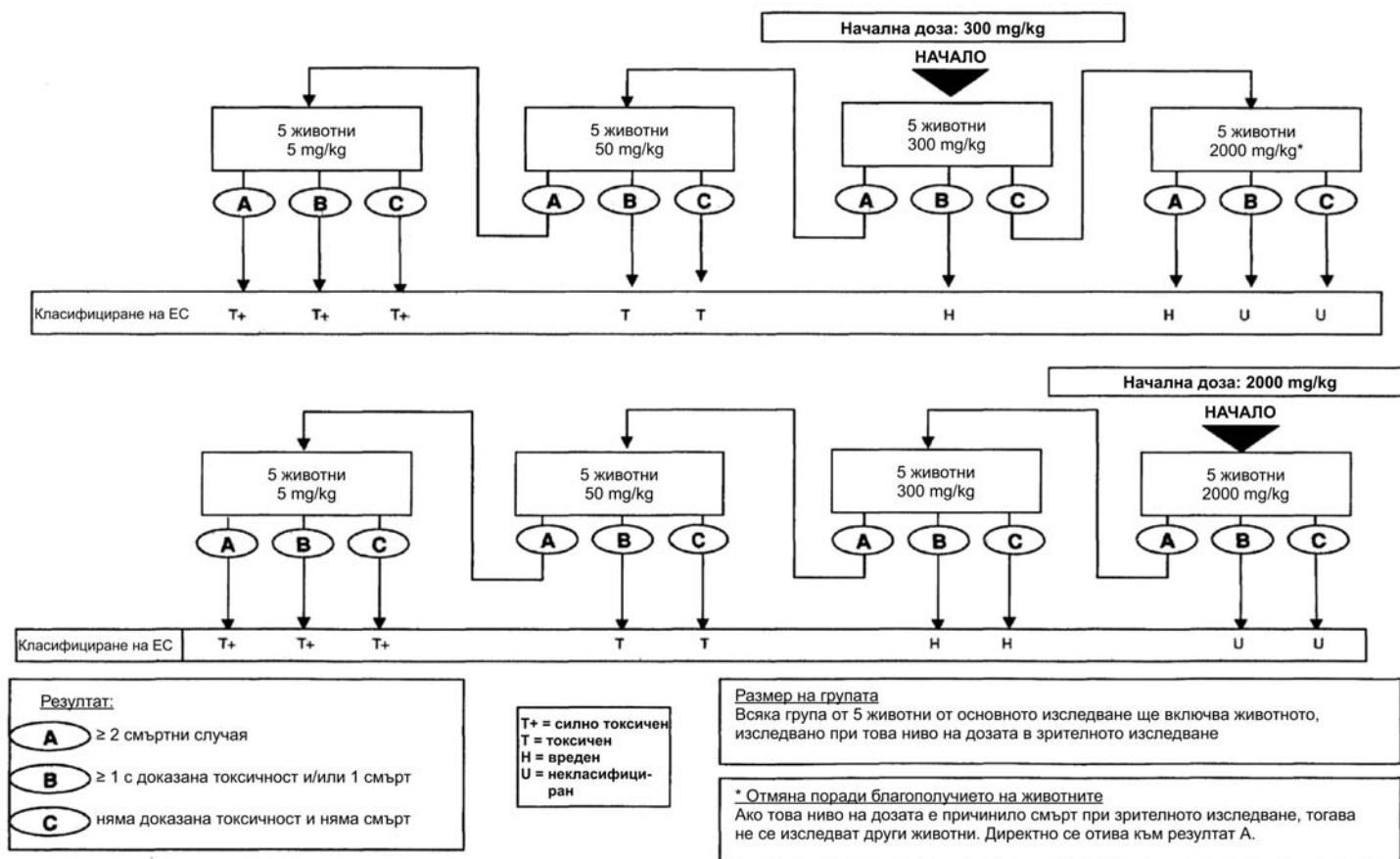
Правилата за вземане на решение, които са указани в следващата процедура, представена в приложение 2, включват доза с ниво 5 000 mg/kg. По този начин, когато при основно изследване се използва начална доза 5 000 mg/kg, резултат А (> 2 смъртни случая) налага изследване на втора група при 2 000 mg/kg; резултат В (доказана токсичност и/или < 1 смъртен случай) или С (нетоксичност) води до резултат веществото да не бъде класифицирано съгласно GHS. По подобен начин, ако се използва начална доза, различна от 5 000 mg/kg, тогава изпитването води до прилагане на 5 000 mg/kg в случай на резултат С при 2 000 mg/kg; резултат А след прилагането на 5 000 mg/kg води до това веществото да бъде определено в категория 5 на GHS, а резултат В или С води до това веществото да не бъде класифицирано.

МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ Б.1А

Ръководство за класифициране съгласно схемата на ЕС за обхващане на преходния период до пълното прилагане на Глобалната система за хармонизиране на класификацията (GHS) (взето от препратка 8)



▼B



▼B**Б.1Б. ОСТРА ОРАЛНА ТОКСИЧНОСТ — МЕТОД КЛАС ОСТРА ТОКСИЧНОСТ****1. МЕТОД**

Този метод за изпитване е еквивалентен на ОИСП TG 423 (2001)

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Методът при клас остра токсичност (1), представен с това изследване, е поетапна процедура, при която се използват по 3 животни от един и същ пол на всеки етап. В зависимост от смъртността и/или състоянието на предстояща смърт при животните може да се наложи средно на 2—4 стъпки да бъде взето решение относно острата токсичност на изпитваното вещество. Тази процедура е репродуктивна, използва много малко животни и дава възможност за категоризиране на веществата по начин, подобен на този при други методи за изпитване за остра токсичност. Методът при клас остра токсичност се основава на биометрични оценки (2)(3)(4)(5) с фиксирани дози, подходящо отделени, за да може едно вещество да бъде категоризирано за целите на класифицирането и оценката на риска. Методът, който е одобрен през 1996 г., е широко утвърден *in vivo* спрямо LD₅₀ данните, получени от публикуваните национални (6) и международни (7) изследвания.

Насоките за избор на най-подходящият метод за изпитване с определена цел се намират в Ръководството за изпитване на острата орална токсичност (8). Това ръководство съдържа също допълнителна информация за провеждането и интерпретирането на метода за тестване Б.1Б.

Изпитваните вещества, в дози, за които е известно, че могат да причинят болка и страдание поради корозивно или силно дразнещо действие, не следва да бъдат прилагани. Умиращи животни или животни, очевидно изпитващи болка или показващи признаци на дълбоко и продължително страдание, биват хуманно убивани и също се вземат предвид при интерпретирането на резултатите, по същия начин както животните, умрели по време на експеримента. Критериите за вземане на решение да бъде убито умиращо или дълбоко страдащо животно и насоки за разпознаване на предсказуема или предстояща смърт са обект на отделно ръководство (9).

При този метод се използват предварително определени дози и резултатите позволяват веществото да бъде категоризирано и класифицирано съгласно Глобалната система (GHS) за хармонизиране на класификацията на химични вещества, които причиняват остра токсичност (10).

По принцип методът цели изчисляването на точната LD₅₀, но позволява установяването на определени области на експозиция, в които се очаква леталност, доколкото смъртност като пропорционално съотношение при животните се достига едва в самия край на това изследване. Методът позволява определяне стойността на LD₅₀ само когато в резултат от прилагането на най-малко две дози се постига ръст на смъртността, по-висок от 0 % и по-нисък от 100 %. Използването на избрани предварително определени дози, независимо от изпитваното вещество, с класифициране, което е категорично свързано с броя на наблюдаваните животни в различните етапи, подобрява възможността за последователно и многократно докладване на резултатите между отделните лаборатории.

▼B

В лабораторията за изследване следва да се вземе предвид цялата налична информация за изследваното вещество преди провеждане на експеримента. Такава информация включва идентичност и химична структура на веществото; неговите физикохимични свойства; резултатите от всякакви други *in vivo* или *in vitro* токсикологични изпитвания на веществото; токсикологични данни за структурно близки вещества и очаквана(и) употреба(и) на веществото. Тази информация е необходима, за да се удостовери напълно, че това изпитване е свързано със защитата на човешкото здраве и ще бъде от полза при избора на най-подходящата начална доза.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Остра орална токсичност: отнася се до онези вредни ефекти, които се появяват в резултат на орален прием на еднократна доза вещество или многократни дози, давани в рамките на 24 часа.

Бавна смърт: означава животното да не умира или да не се проявят признаци на смърт в рамките на 48 часа, но да умре по-късно, през 14-дневния период на наблюдения.

Доза: е количеството прието изпитвано вещество. Дозата се изразява като маса на изпитваното вещество за единица тегло на изследваното животно (напр. mg/kg).

GHS: Глобална система за хармонизиране на класификацията на химични вещества и смеси. Съвместна дейност на ОИСР (човешко здраве и околна среда), Комитета на ООН от експерти в областта на транспортирането на опасни стоки (физикохимични свойства) и МОТ (опасни комуникации) и координирана чрез Междуорганизационната програма за правилно управление на химикалите (ЮМС).

Неизбежна смърт: когато животното умира или се очаква настъпването на смърт преди следващото планирано време за наблюдение. Признаците, показващи това състояние при гризачи, могат да включват конвулсии, латерално (странично) положение, лежане и треперене. (Вж. Ръководството за хуманен край (9) за повече подробности.)

LD₅₀ (средна летална орална доза): е статистически получена еднократна доза на вещество, за която може да се очаква, че ще причини смърт при 50 % от животните, когато бъде въведена в тях по орален път. Стойността LD₅₀ се изразява за периоди като масата на изпитваното вещество за единица тегло на изследваното животно (mg/kg).

Ограничена доза: отнася се до доза с по-голямо ограничение при изследването (2 000 или 5 000 mg/kg).

Настъпване на смърт: оставане в терминално състояние или неспособност да се оцелее, дори ако се приложи лечение. (Вж. Ръководството за хуманен край (9) за повече подробности.)

Предсказуема смърт: присъствие на клинични признаци, които показват, че е налице смърт в определен предстоящ период от време преди планирания край на експеримента, например: неспособност да се достигне вода или храна. (Вж. Ръководството за хуманен край (9) за повече подробности.)

▼B

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ

Принцип на метода за изследване е, че въз основа на поетапна процедура, при която се използват минимален брой животни на етап, се получава допълнителна информация за острата токсичност на изследваното вещество, която дава възможност за неговото класифициране. Веществото се приема по орален път на постъпване от група експериментални животни в една от определените дози. Веществото се изпитва чрез прилагане на поетапна процедура, като на всеки етап се използват по три животни от един и същ пол (обикновено женски индивиди). Наличието или отсъствието на смъртни случаи, свързани с веществото на един етап, е определящо за дозирането на следващия етап, т.е.:

- не са необходими допълнителни изследвания;
- дозиране на три допълнителни животни със същата доза;
- дозиране на три допълнителни животни с по-високо или по-ниско ниво на дозата.

Подробностите около провеждането на процедурата за изпитване са описани в приложение 1. Методът дава възможност да се вземе решение относно класифицирането на изследваното вещество и да бъде причислено към един от поредицата токсикологични класове чрез определяне на точните стойности на LD₅₀.

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

1.4.1. Избор на животински видове

Предпочитаният вид от групата на гризачите е плъх, въпреки че и други видове гризачи могат да бъдат използвани. Обикновено се използват животни от женски пол (9). Причина за това е, че изследванията в научната литература чрез конвенционални тестове с LD₅₀ показват, че независимо от малката разлика в междуполовата сетивност в случаите, при които се наблюдават различия, женските индивиди като цяло са малко по-чувствителни (11). Въпреки това, ако познанията за токсикологичните и токсикокинетичните свойства на близки по структура химически вещества показват, че има вероятност мъжките индивиди да са по-чувствителни от женските, тогава се използват животни от този пол. Когато изпитването се провежда върху мъжки индивиди, то следва да бъде подходящо обосновано.

Използват се здрави млади полово зрели животни от най-често употребяваните за лабораторни изследвания видове. Женските индивиди следва да не са раждали и да не са бременни. Всяко животно в началото на дозирането му следва да бъде на възраст между 8 и 12 седмици и теглото му следва да попада в интервала $\pm 20\%$ от средното тегло на всички дозирани преди това животни.

1.4.2. Условия за отглеждане и хранене

Температурата в стаята на опитните животни следва да бъде 22 °C (± 3 °C). Въпреки че относителната влажност следва да бъде поне 30 % и е препоръчително тя да не надвишава 70 % освен при почистване на стаята, като целта е да се постигне 50—60 % относителна влажност. Светлината следва да бъде изкуствена, с редуващи се 12 часа светъл период, 12 часа тъмен период. За хранене могат да бъдат използвани конвенционалните лабораторни диети с неограничен достъп до питейна вода. Животните могат да бъдат групирани в клетките по доза, но броят на животните в клетка не трябва да възпрепятства точните наблюдения върху всяко животно.

▼B**1.4.3. Подготовка на животните**

Животните са произволно избрани, маркирани, за да е възможно индивидуалното им идентифициране, и държани в клетките си поне 5 дни преди дозирането, за да се аклиматизират към лабораторните условия.

1.4.4. Подготовка на дозите

Най-общо изпитваните вещества следва да бъдат приемани в постоянен обем в рамките на дозите, които се изпитват чрез изменения в концентрацията на дозирания препарат. Когато обаче крайният продукт, който трябва да бъде изследван, е под формата на течност или смес, за последващата оценка на риска от това вещество може да се окаже по-подходяща употребата му в неразредено състояние, т.е. при постоянна концентрация, което е и изискване от страна на някои регулаторни органи. Във всеки случай обемът на максималната доза за администриране не следва да бъде завишаван. Максималният обем на течността, която може да бъде въведена наведнъж, зависи от големината на изследваното животно. При гризачи обикновено обемът не надвишава 1 ml/100 g телесно тегло; обаче в случай на водни разтвори може да се приемат 2 ml/100 g телесно тегло. Във връзка с изготвянето на дозирани препарати се препоръчва, където е възможно, да се използва воден разтвор/суспензия/емулсия, следван първоначално от разтвор/суспензия/емулсия в масло (напр. царевично масло), а след това е възможен разтвор в други разтворители. Следва да се знаят токсикологичните характеристики на разтворителите с изключение на водата. Дозите следва да бъдат приготвяни кратко време преди приемането им, освен когато е известно, че препаратът остава стабилен и в добро състояние през периода, в който се използва.

1.5. ПРОЦЕДУРА**1.5.1. Приемане на дозите**

Изпитваното вещество се приема на еднократни дози чрез принудително хранене или с подходяща интубационна канюла. При извънредни обстоятелства, при които приемането на еднократна доза не е възможно, дозата може да бъде давана на по-малки части през период, който не може да превишава 24 часа.

Преди дозирането животните следва да бъдат поставени на ограничен режим на хранене за известно време (напр. на плъхове следва да не се дава храна, но не и вода през нощта преди експеримента; на мишки в продължение на 3—4 часа следва да не се предоставя храна, но не и вода). След периода на „постене“, животните следва да бъдат претеглени и изпитваното вещество да бъде приложено. След като веществото бъде прието, може да не се предоставя храна в следващите 3—4 часа при плъхове или 1—2 часа при мишки. Когато дозата се приема на части в определен период от време, може да се наложи да бъдат осигурени храна и вода на животните в зависимост от продължителността на периода.

1.5.2. Брой на животните и нива на дозите

Във всеки етап се използват по три животни. Нивото на дозата, която ще бъде използвана като начална доза, се избира от едно от четирите фиксирани нива: 5, 50, 300 и 2 000 mg/kg телесно тегло. Нивото на началната доза следва да бъде такова, при което вероятността да причини смърт при някое от дозираните животни е най-висока. Графичните алгоритми на приложение 1 описват процедурата, която трябва да бъде следвана за всяка от началните дози. Освен това приложение 4 дава насоки за класифициране по системата на ЕС, докато бъде въведена новата система GHS.

▼B

Когато по наличната информация се предполага, че смъртност при начално дозиране с най-високото ниво (2 000 mg/kg телесно тегло) е малко вероятна, тогава се прилага ограничено изпитване. Когато няма информация за изпитваното вещество, с цел хуманно отношение към животните се препоръчва за начална доза да се използва 300 mg/kg телесно тегло.

Интервалът от време между третирането на групите се определя от началото, продължителността и остротата на токсичните признаци. Третирането на животните със следваща доза следва да бъде забавено, докато не се докаже, че дозираните по-рано животни са останали живи.

По изключение и само когато е оправдано от определени регулаторни нужди, може да бъде приложена допълнителна фиксирана доза с по-високо ниво 5 000 mg/kg телесно тегло (вж. приложение 2). По причини, свързани с хуманното отношение към животните, изследването на животни в категория 5 от GHS в обхвата 2 000—5 000 mg/kg е нежелателно и следва да се има предвид само когато съществува голяма вероятност резултатите от такова изследване да имат практическо значение за опазване здравето на хората или животните или околната среда.

1.5.3. Ограничено изпитване

Ограниченото изпитване се използва предимно в случаите, при които извършващият опитите разполага с информация, съгласно която изследваният материал по всяка вероятност не е токсичен, т.е. проявява токсичност само над нормативно ограничените дози. Информация за токсичността на изпитвания материал може да бъде получена от познания за подобни изпитани съединения или подобни изпитани смеси или продукти, като се вземат предвид идентичността и процентното съдържание на съставките, за които е известно, че са с токсикологично значение. В случаите, когато има малко или няма информация за неговата токсикологичност, или при които се очаква изпитваният материал да бъде токсичен, следва да се провежда основното изследване.

При ниво на еднократна доза 2 000mg/kg телесно тегло може да бъде проведено ограничено изследване на 6 животни (по три животни на етап). По изключение може да бъде проведено ограничено изследване на три животни при ниво на еднократната доза 5 000 mg/kg (вж. приложение 2). Ако има смъртни случаи, свързани с веществото, може да се окаже необходимо следващите изследвания да се проведат при по-ниски нива на дозиране.

1.6. НАБЛЮДЕНИЯ

Животните се наблюдават индивидуално, след поне еднократно дозиране през първите 30 минути, периодично през първите 24 часа, с повишено внимание през първите 4 часа и ежедневно след това през общо 14-дневен период от време, освен когато е необходимо да бъдат извадени от експеримента и убити по хуманен начин по причини на хуманно отношение към животните, или са намерени мъртви. Продължителността на наблюдението обаче не следва да бъде строго фиксирана. Тя следва да се определя въз основа на токсичните реакции, началния момент и продължителността на периода за възстановяване и може да бъде увеличена, когато се сметне за необходимо. Периодите от време, в които се появяват и изчезват признаците на токсичност, са важни, особено ако има тенденция токсичните признаци да бъдат забавени (12). Всички наблюдения систематично се записват, с отделни записи, направени за всяко животно.

▼B

Допълнителни изследвания ще бъдат необходими, ако животните продължат да показват признаци на токсичност. Наблюденията следва да включват промените в кожата и козината, очите и лигавицата и също дихателната, кръвоносната, автономната и централната нервна система, соматомоторната активност и моделите на поведение. Вниманието следва да бъде насочено към наблюдения на треперене, конвулсии, сленоотделяне, диария, летаргия, сън и кома. Следва да бъдат взети предвид принципите и критериите, резюмирани в Ръководството за хуманен край (9). Животните, намерени в терминално състояние, и животните, показващи дълбока болка или непрекъснати признаци на дълбоко страдание, следва да бъдат убити по хуманен начин. Когато животните са убити по хуманни причини или са намерени мъртви, времето на смъртта им следва да бъде записано колкото е възможно по-точно.

1.6.1. Телесно тегло

Индивидуалното тегло на животните следва да бъде измервано в кратък интервал от време преди приемането на изпитваното вещество и поне веднъж седмично след това. Промените в теглото следва да бъдат изчислявани и записвани. В края на експеримента оцелелите животни се претеглят и след това се убиват по хуманен начин.

1.6.2. Патология

Всички изследвани животни (включително умрелите по време на експеримента или извадените от експеримента животни по причини на хуманно отношение към животните) следва да бъдат подложени на цялостна аутопсия. Всички цялостни патологични изменения във всяко животно следва да бъдат записани. Микроскопските изследвания на органите, даващи доказателства за цялостна патология при животните, оцелели 24 часа или повече след първоначалното дозиране, също могат да допринесат за получаването на полезна информация.

2. ДАННИ

Следва да бъдат осигурени индивидуални данни за всяко животно. Освен това всички данни следва да бъдат обобщени в таблична форма, показваща броя на използваните животни във всяка от изследваните групи, броя на животните, проявяващи признаци за токсичност, броя на животните, намерени мъртви по време на изследването или убити по хуманни причини, времето на настъпване на смъртта на животноинския индивид, описание и развитие във времето на токсичните ефекти и обратимостта им, както и заключенията от аутопсията.

3. ОТЧИТАНЕ**3.1. Протокол от изпитването**

Протоколът от изпитването по целесъобразност следва да включва следната информация:

Изпитвано вещество:

— физична форма, чистота и, където е подходящо, физико-химични свойства (включително изомеризация);

— данни за идентичността, включително CAS номер.

Разтворител (ако има такъв):

— обосноваване на избора на разтворител, ако е различен от вода.

Изследвани животни:

— използвани видове/породи;

▼B

- микробиологично състояние на животните, когато е известно;
- брой, възраст и пол на животните (включително, при необходимост, обосноваване на използването на мъжки индивиди вместо женски);
- водоизточник, условия за отглеждане, диета и т.н.

Условия на експеримента:

- подробности за формулирането на изпитваното вещество, включително подробности за физичното състояние на приемания материал;
- подробности, свързани с приемането на изпитваното вещество, обеми на дозите и време на дозиране;
- подробности във връзка с качеството на храната и водата (включително вид/източник на диетата, водоизточник);
- обосновка на избора на началната доза.

Резултати:

- таблици/диаграми на получените данни и ниво на дозата за всяко животно (т.е. при които животното показва признаци на токсичност, включително смърт; природа, острота и продължителност на ефектите);
- таблици/диаграми на телесното тегло и на измененията в него;
- индивидуални тегла на животните през деня на дозиране, на седмични интервали след това и при смърт;
- дата и време на смъртта, ако умрат преди приключване на програмата;
- развитие във времето от първоначалното появяване на признаци за токсичност и дали е имало обратимост за всяко животно;
- заключения при аутопсията и хистопатологични заключения за всяко животно, ако има такива.

Дискусия и интерпретиране на резултатите.

Заключения.

4.

ПРЕПРАТКИ

- (1) Roll R., Hüfner-Bosse Th. and Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. *Toxicol. Lett.*, Suppl. 31, 86
- (2) Roll R., Riebschläfder M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. *Bundesgesundheitsblatt* 32, 336—341.
- (3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 68, 559—610
- (4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 729—734.
- (5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC₅₀ Tests. *ALTEX* 16, 129—134
- (6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method — An Alternative to the LD₅₀ Test. *Arch. Toxicol.* 66, 455—470.

▼B

- (7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 659—670.
- (8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.
- (9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.
- (10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-№-24-№-0,FF.html>]
- (11) Lipnick R. L., Cotruvo, J. A., Hill R. N., Bruce R. D., Stitzel K. A., Walker A. P., Chu I; Goddard M., Segal L., Springer J. A. and Myers R. C. (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD₅₀, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol* 33, 223—231.
- (12) Chan P. K. and A. W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A. W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.



ПРИЛОЖЕНИЕ 1

**ПРОЦЕДУРА, КОЯТО ТРЯБВА ДА БЪДЕ СЛЕДВАНА ЗА ВСЯКА ОТ
НАЧАЛНИТЕ ДОЗИ**

ОБЩИ БЕЛЕЖКИ

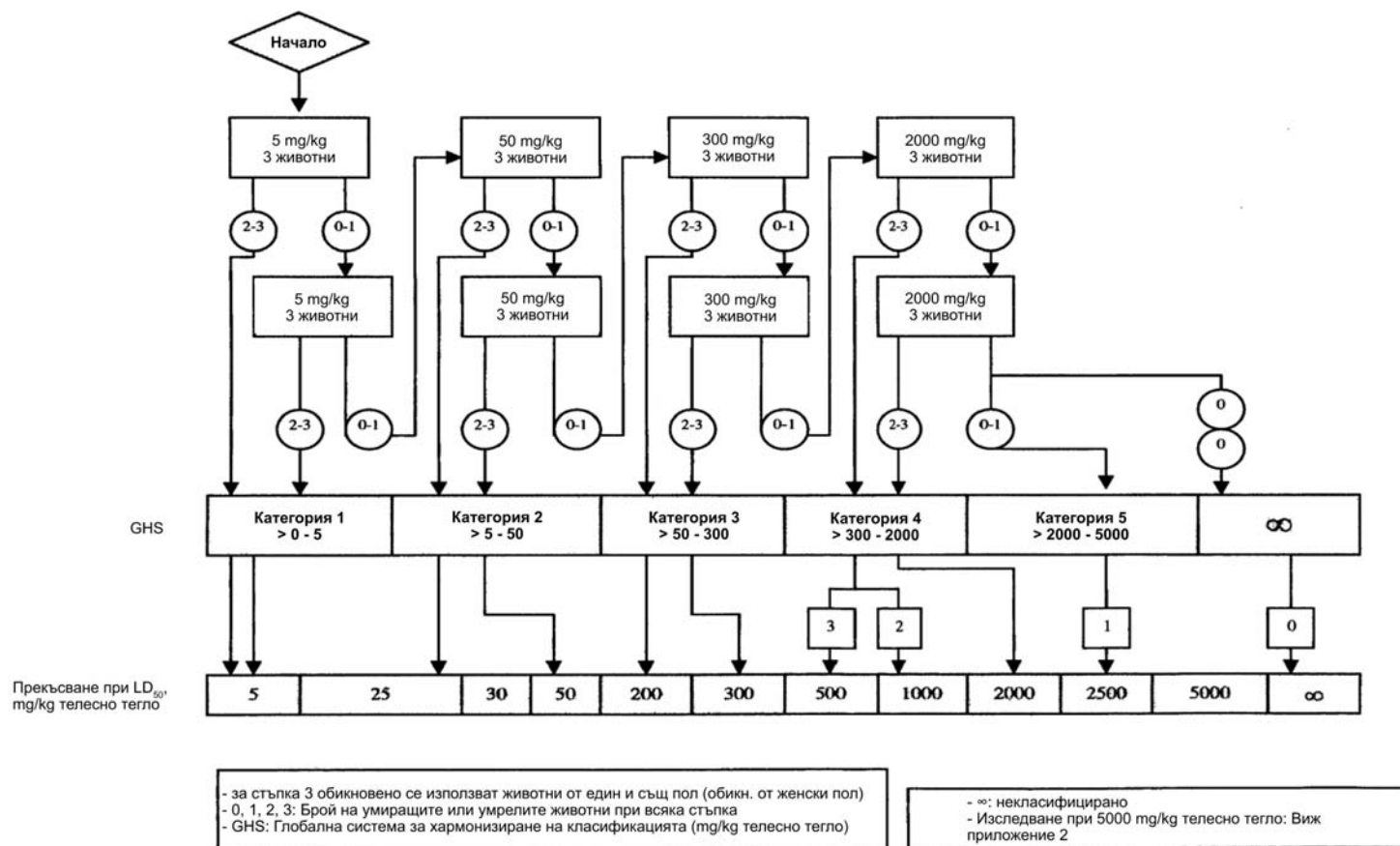
За всяка начална доза в това приложение са включени съответните схеми за изпитване, които трябва да бъдат следвани.

- Приложение 1а: началната доза е 5 mg/kg тт
- Приложение 1б: началната доза е 50 mg/kg тт
- Приложение 1в: началната доза е 300 mg/kg тт
- Приложение 1г: началната доза е 2 000 mg/kg тт

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

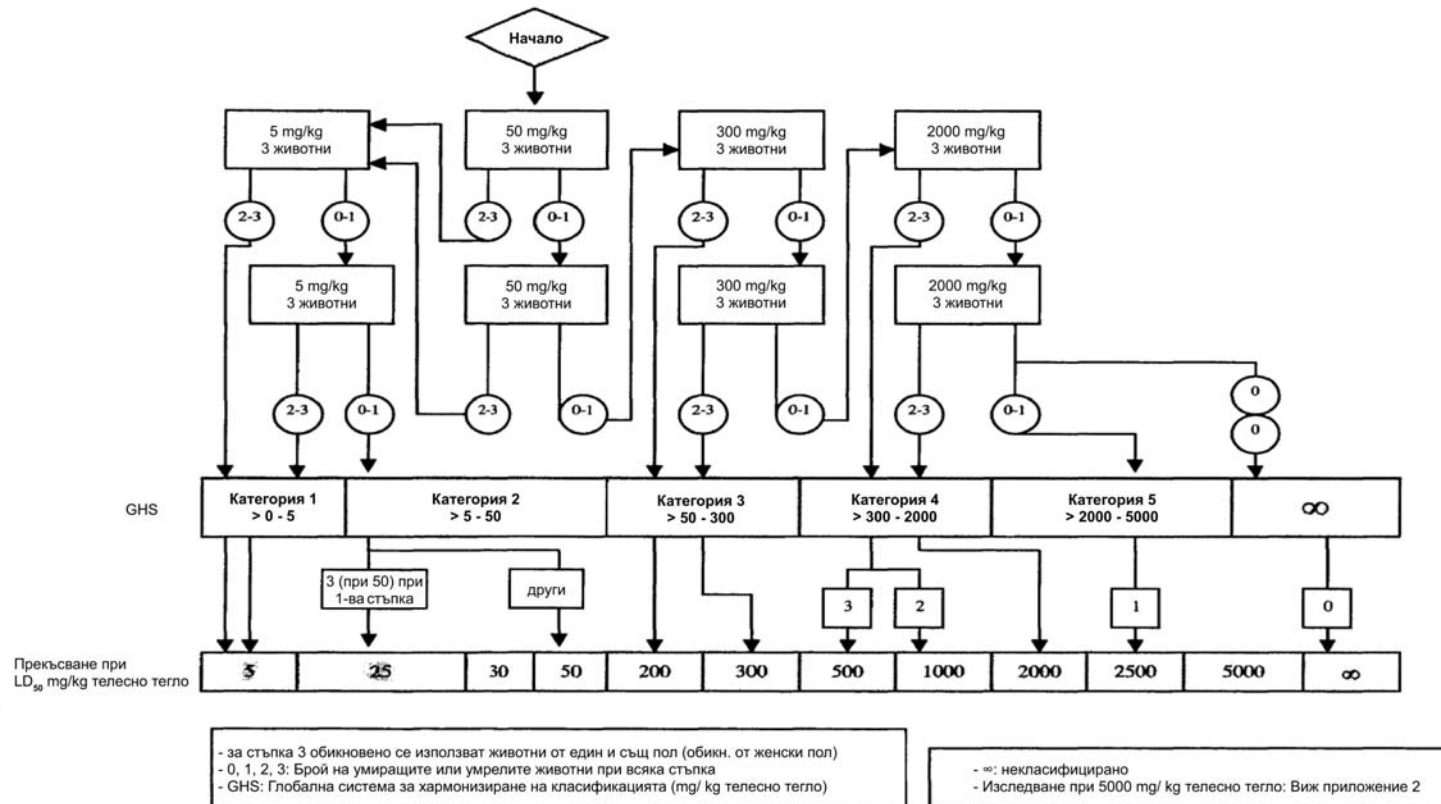
ПРИЛОЖЕНИЕ 1А

ПРОЦЕДУРА ЗА ИЗПИТВАНЕ С НАЧАЛНА ДОЗА 5 МГ/КГ ТЕЛЕСНО ТЕГЛО



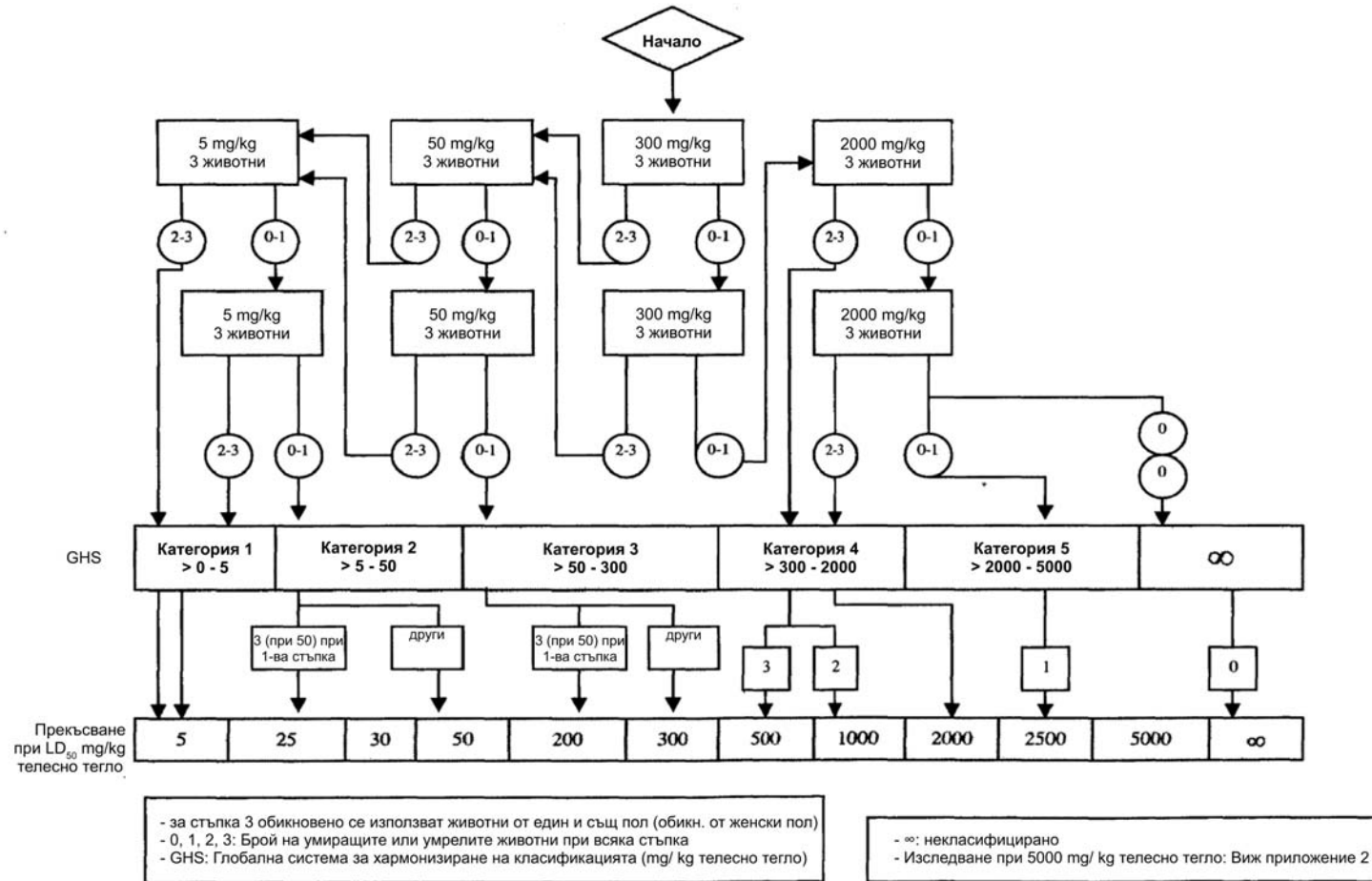
ПРИЛОЖЕНИЕ 1Б

ПРОЦЕДУРА ЗА ИЗПИТВАНЕ С НАЧАЛНА ДОЗА 50 MG/KG ТЕЛЕСНО ТЕГЛО

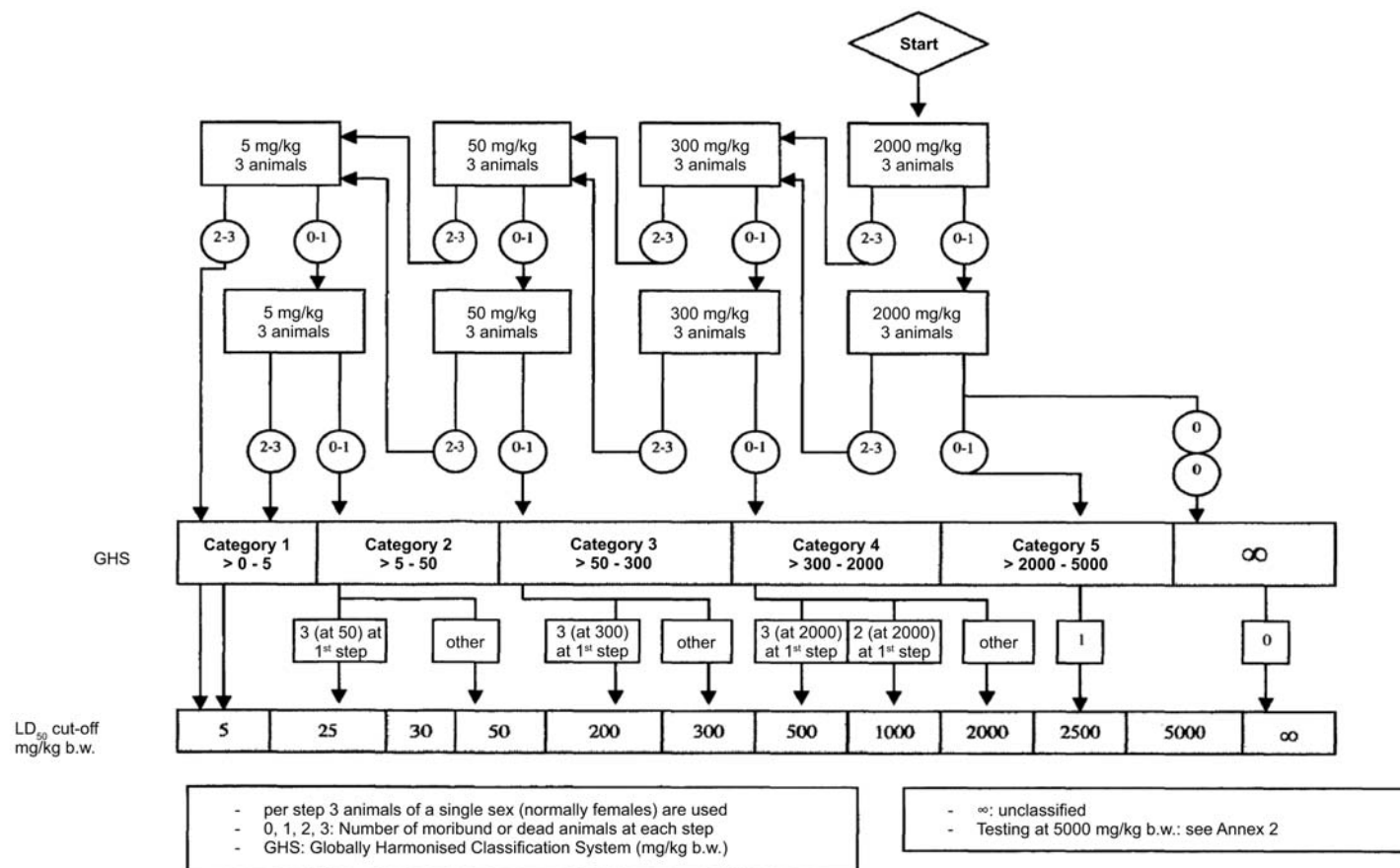


ПРИЛОЖЕНИЕ 1В

ПРОЦЕДУРА ЗА ИЗПИТВАНЕ С НАЧАЛНА ДОЗА 300 МГ/КГ ТЕЛЕСНО ТЕГЛО



ПРОЦЕДУРА ЗА ИЗПИТВАНЕ С НАЧАЛНА ДОЗА 2 000 МГ/КГ ТЕЛЕСНО ТЕГЛО





ПРИЛОЖЕНИЕ 2

КРИТЕРИИ ЗА КЛАСИФИЦИРАНЕ НА ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО С ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ НА LD₅₀ НАД 2 000 MG/KG БЕЗ, НЕОБХОДИМОСТ ОТ ИЗПИТВАНЕ

Критериите за категория на опасност 5 са предназначени да подпомогнат идентифицирането на изпитвани вещества, които представляват относително ниска остра токсикологична опасност, но които при определени обстоятелства могат да представляват опасност за уязвимото поколение. Тези вещества се очаква да имат орална или дермална LD₅₀ в обхвата от 2 000 до 5 000 mg/kg или еквивалентни дози при други начини на въвеждане. Изпитваното вещество следва да бъде класифицирано в категория на опасност, определена по: $2\,000\text{ mg/kg} < LD_{50} < 5\,000\text{ mg/kg}$ (категория 5 от GHS) в следните случаи:

- а) ако е насочено към тази категория по някоя от схемите за изследване от приложения 1a—1г, основани на смъртни инциденти;
- б) ако вече съществува достоверно доказателство, което показва, че LD₅₀ е в обхвата от стойности на категория 5, или други изследвания върху животни, или токсикологични изследвания върху хора дават основание за сериозно безпокойство поради въздействие върху здравето на човека;
- в) чрез данни от екстраполации, оценяване или измерване, ако няма основание да се отнесе към по-висок клас на опасност, и
 - има налична достоверна информация, показваща значителни токсикологични ефекти при хората, или
 - се наблюдава смърт при изпитване със стойности, по-високи от посочените в категория 4 по орален начин на въвеждане, или
 - когато експертната оценка потвърди значимите клинични признаци на токсичност при изпитване със стойности, по-високи от тези в категория 4, освен при диария, пилоерекция или недобър външен вид, или
 - когато експертната оценка потвърди достоверната информация, която посочва потенциална възможност за значителни остри ефекти от други изследвания върху животни.

ИЗСЛЕДВАНЕ С ДОЗИ НАД 2 000 MG/KG

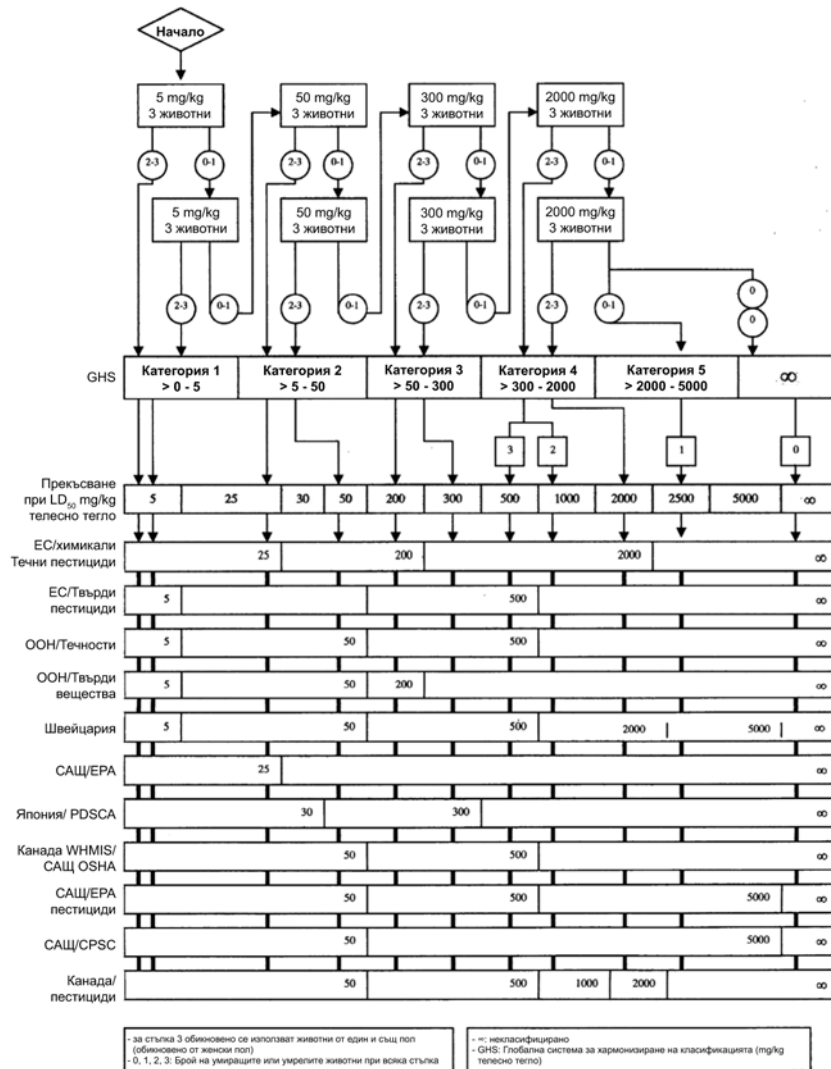
Признавайки необходимостта от запазване на хуманно отношение към животните, изследването на животни, попадащи в обхвата на категория 5 (5 000 mg/kg), не е препоръчително и следва да бъде разглеждано само когато има голяма вероятност резултатите от такова изследване да имат пряко практическо значение за опазване здравето на хората или животните (10). Следва да не бъдат провеждани допълнителни изследвания при по-високи нива на дозите.

Когато за изследването се изисква прилагане на доза 5 000 mg/kg, се изпълнява само един етап (т.е. три животни). Ако първото дозирано животно умре, тогава продължава дозирането при 2 000 mg/kg в съответствие с графичния алгоритъм в приложение 1. Ако първото животно оцелее, се дозират и другите две животни. Ако само едно от трите животни умре, се очаква стойността на LD₅₀ да надвишава 5 000 mg/kg. Ако и двете животни умрат, тогава дозирането продължава при 2 000 mg/kg.

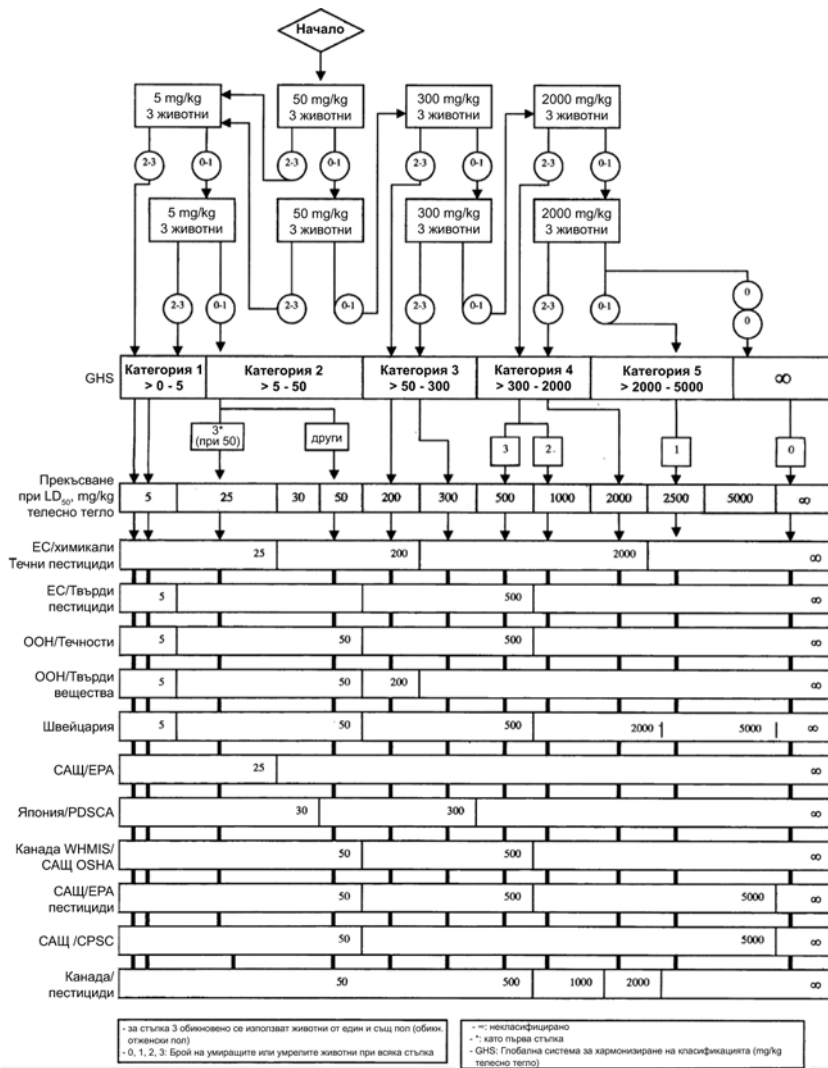


ПРИЛОЖЕНИЕ 3

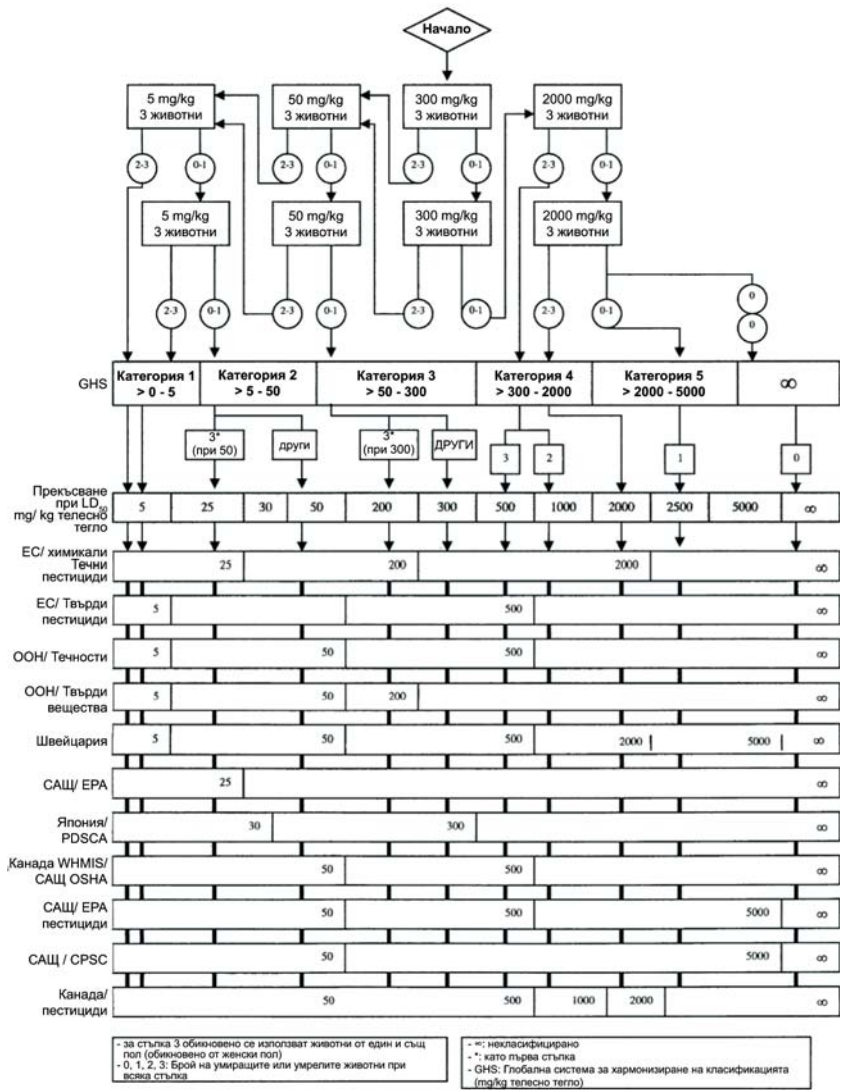
МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ Б.16: Ръководство за класифициране съгласно схемата на ЕС за обхващане на преходния период до пълното прилагане на Глобалната система за хармонизиране на класификацията (GHS) (взето от препратка 8)



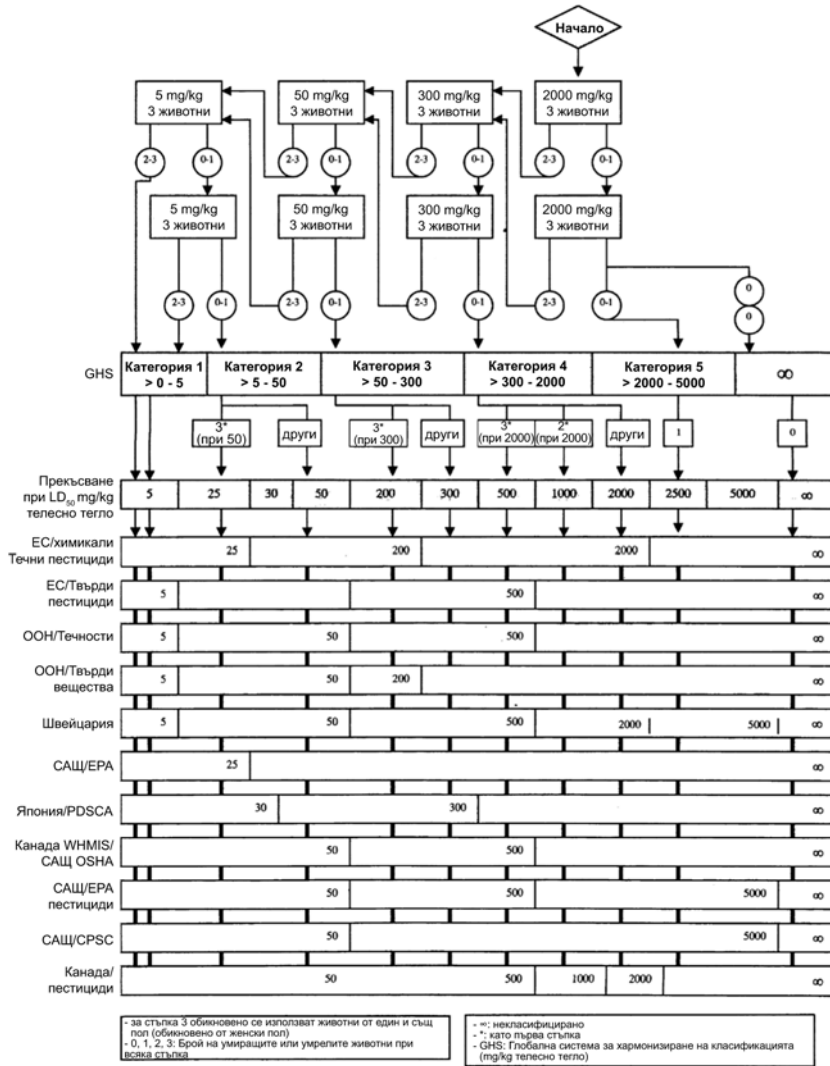
▼B



▼B



▼B



▼ M4**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 \times 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 \times 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 (AEGL), 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 етикетироване, по принцип се препоръчва глава Б.52. 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)].

▼ M4

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 подбирани 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. LC₅₀, LC₀₁ 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.

▼ **M4****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. 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).

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.

▼ **M4****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 μm , и с геометрично стандартно отклонение (σ_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 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

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 случай, 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.

▼ **M4****Температура и относителна влажност на камерата**

19. Температурата в камерата трябва да се поддържа на 22 ± 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 непоситжимо (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 периодично в зависимост от метода за анализ. Когато се прилага периодично пробовземане пробите от атмосферата в камерата трябва да се вземат най-малко два пъти при четиричасово изследване. Ако това е практически неосъществимо поради ограничена

▼ **M4**

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, отделени 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 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 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 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)].

▼ **M4****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 зрително изследване, освен ако са достъпни някакви данни за изпитвания химикал, като например предходно изследване по глава Б.52. [вж. GD 39 (2)].

Зрително изследване: Традиционен протокол

28. Зрителното изследване се използва за изчисляване на ефикасността на изпитвания химикал, за установяване на евентуални разлики във възприемчивостта между половете 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 зрителното 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 половете). Дадено зрително изследване може да се състои от една-единствена концентрация, но ако е необходимо могат да бъдат изпитвани повече концентрации. При зрителното изследване не следва да се изпитват голям брой животни и концентрации по такъв начин, че същото да наподобява основно изследване. Вместо зрително 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.

▼ **M4**

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 LC₅₀, но по принцип протоколът C × t е по-ефективен при получаване на устойчиви стойности за LC₀₁ и LC₁₀ (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 плъха 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).

▼ M4

Зрително изследване: Протокол C × t

35. Зрителното 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 зрително 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 половите. 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 зрително изследване, ако са достъпни данни за смъртността от изследване по Б.52. (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.52. (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 зрителното 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.

▼ **M4****Основно изследване: Протокол $C \times t$**

39. Първоначалната концентрация (сесия I от експозицията) (допълнение 1), изпитвана при основното изследване, ще 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 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, слюноотделяне, 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.

▼ **M4****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, 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.
45. С оглед увеличаване на стойността за интерпретиране на изследването могат да бъдат разгледани 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**

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;

▼ M4*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 носител (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,

▼ **M4**

- всички концентрации във въздуха следва да се докладват в единици за масова концентрация (напр. mg/l, mg/m³ и т.н.); единици за отношение на обем (напр. ppm, 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 (σ_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 σ_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. LC₅₀, LD₀₁), включително 95 %-ен доверителен интервал и наклон на крива (ако се предоставят от метода за оценка),
- статистическо отношение, включително оценка за експонент n (протокол $C \times t$). Следва да бъде предоставено наименованието на използвания статистически софтуер;

▼ **M4***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,
- 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, етикетването 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.

▼M4

- (11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27: 160-167.
- (12) Zwart 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 $C \times t$ 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.

▼ **M4***Допълнение 1***Протокол C × t**

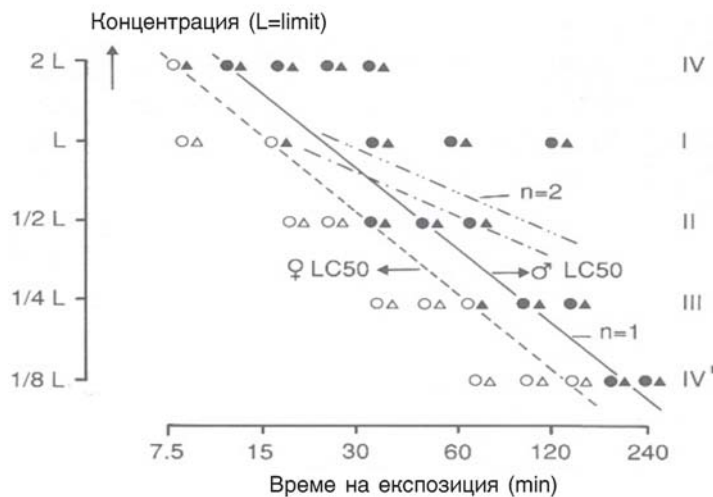
1. Поетапното изследване C × t може да бъде разглеждано като алтернатива на традиционния протокол при оценка на инхалаторната токсичност (12) (13) (14). То следва да се извършва преференциално когато е налице специфична регулаторна или научна необходимост, която изисква изпитване на животни с различна 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 плъха 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 сбъждане на оценките и разширява доверителния интервал по отношение на описания 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).

▼ **M4**

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:

▼ **M4**

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 ^(а)
- Целева концентрация ^(б)
- Експонират се пет групи животни на тази целева концентрация за продължителности съответно от 15, 30, 60, 120 и 240 минути.

↓

Сесия II от експозицията ^(в) — Основно изследване

- 1 животно от всеки пол за концентрация/времева точка; общо 10 животни.
- Експонират се пет групи животни при по-ниска концентрация ^(г) ($1/2 L$, 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 ^(д) ($1/4 L$) 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 ^(е) ($1/8 L$) с малко по-продължителни експозиции (разположени с отстояние във времето, определено от геометрична прогресия с частно $\sqrt{2}$; вж. фигура 1).

↓ **или**

^(а) Ако не е налична информация, отнасяща се за възприемчивост полове, се използват пълхове 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.

^(б) 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 избрани по-ниски начални концентрации. В случай на регулаторна или научна необходимост могат да бъдат използвани по-високи концентрации. = пределна концентрация.

^(в) 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.

^(г) Минималната доза (концентрация × 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 × 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 настойчиво 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 настойчиво се препоръчва следващите концентрации и продължителности да бъдат адаптирани по съответен начин.

▼ **M4****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 ⁽⁴⁾ (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 × t

11. Процедура C × 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 × t може да бъде изчислена с използване на статистически анализ (16):

Уравнение 1:

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

където C = концентрация; t = продължителност на експозицията, или
Уравнение 2:

$$Отговор = f(C^n t)$$

където n = b_1/b_2 .

С помощта на уравнение 1 стойността на LC₅₀ 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 LC₀₁ може да бъде изчислена при P = 2,67.

⁽⁴⁾ 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.

▼B**Б.3. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ (ДЕРМАЛНА)****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Вж. Общо въведение, част Б, буква А.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Вж. Общо въведение, част Б, буква Б.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Изпитваното вещество в нарастващи дози се нанася върху кожата при няколко групи експериментални животни, като за всяка група се използва по една доза. След това се провеждат наблюдения върху вредните ефекти и смъртните случаи. Животните, умрели по време на изпитването, се подлагат на аутопсия. Оцелелите животни се аутопсират в края на изпитването.

Животните с остри и продължителни симптоми на болка и стрес може да се наложи да бъдат убити по безболезнен начин. Не бива да се прилага дозиране на изследваните вещества по начини, за които е известно, че причиняват силна болка и стрес, поради характерни за тях ефекти на разяждане или силно дразнене.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ**1.6.1. Подготовка**

Животните се разполагат по клетки и се държат и хранят в експериментални условия най-малко пет дни преди началото на експеримента. Преди изпитването млади, полово зрели животни в добро здравословно състояние се подбират по произволен начин и се разпределят на групи. Приблизително 24 часа преди опита козината по гръбната (дорзалната) част на тялото се отстранява чрез подрязване или бръснене. Следва да се внимава да не се охлузи кожата, защото това би могло да промени нейната пропускливост. За прилагането на изпитваното вещество е необходимо да се почистят най-малко 10 % от повърхността на тялото. При изпитването на твърди вещества (които може да се приведат в прахообразно състояние) веществото следва добре да се омокри с вода или, ако е необходимо, с подходящ носител, за да се осигури добър контакт с кожата. Ако се използва носител, следва да се има предвид неговото влияние върху проникването на веществото през кожата. По принцип течните вещества се прилагат без разреждане.

1.6.2. Условия на изпитването**1.6.2.1. *Опитни животни***

Могат да се използват плъхове или зайци в зряла възраст. Възможно е използването и на други видове животни, но за това е необходима обосновка. Използват се обикновените лабораторни породи. Вариациите в телесната маса на животните в началото на изпитването не бива да надвишават $\pm 20\%$ от съответната средна стойност за всеки от двата пола.

▼B1.6.2.2. *Брой и пол*

При всяко ниво на дозиране се използват най-малко пет животни. Всички те следва да са от един и същи пол. Женските не бива да са раждали, както и да не са бременни. Ако има информация, че един от двата пола проявява значително по-висока чувствителност, то се използват животни от този пол.

Забележка: При изследванията за остра токсичност с животни от по-висш разред от гризачите, следва да се обмисли употребата на по-малък брой животни. Дозите следва да се подбират внимателно, като се полагат усилия да не се надвишават умерено токсичните дози. При тези изпитвания се избягва прилагането на летални дози от веществото.

1.6.2.3. *Нива на дозите*

Те следва да са достатъчно на брой (поне три) и да са правилно разпределени количествено, така че при изпитването да се получат групи от животни с определен обхват от токсични ефекти и нива на смъртност. При определянето на нивата на дозите следва да се вземат под внимание всички ефекти на дразнене и разяждане на кожата. Данните следва да са достатъчни за получаването на крива доза/отговор и, когато е възможно, да позволяват приемливо определяне на LD₅₀.

1.6.2.4. *Гранично изпитване*

С помощта на описаните по-горе процедури може да се проведе гранично изпитване с една доза на ниво най-малко 2 000 mg/kg телесна маса върху група от 5 мъжки и 5 женски животни. Ако това доведе до смъртност, свързана със съединението, може да се реши провеждане на пълното изследване.

1.6.2.5. *Период на наблюдение*

Периодът на наблюдение следва да бъде най-малко 14 дни. Продължителността на наблюдението обаче не бива да се фиксира точно. Тя се определя от реакциите на токсичното въздействие, скоростта, с която те настъпват, и времетраенето на възстановителния период. Така тя може да се удължи, докато се сметне за необходимо. Времето, за което се появяват и изчезват симптомите на токсичното действие, тяхната продължителност и моментът на смъртта са важни, особено когато съществува тенденция към забавяне на смъртния изход.

1.6.3. **Процедура**

Животните се разполагат по клетки индивидуално. Изпитваното вещество се нанася равномерно върху площ около 10 % от общата повърхност на тялото. При силно токсичните вещества покритата повърхност от тялото може да бъде и по-малка, но при всички случаи покриването следва да стане на колкото е възможно по-тънък и равномерен пласт.

Изпитваните вещества се поддържат в контакт с кожата с помощта на марлена превръзка и лепенки, които не предизвикват дразнене. Времетраенето на експозицията е 24 часа. Мястото на прилагане следва да се покрие допълнително по подходящ начин, така че марлята и веществото да са добре закрепени и да се избегне възможността животното да погълне веществото. За тази цел може да се използват приспособления за ограничаване на движенията, но пълното обездвижване на животното не е препоръчително.

▼ B

В края на експозиционния период останалото вещество се отстранява, като кожата се почиства с вода (ако е възможно) или по друг подходящ начин.

Наблюденията се записват системно в реда, в който са направени. За всяко животно се води индивидуален протокол. През първия ден наблюденията се провеждат често. Поне веднъж на всеки работен ден се прави обстоен клиничен преглед. Останалите наблюдения се провеждат ежедневно, като се прави всичко възможно загубата на животни да бъде сведена до минимум, например аутопсия или замразяване на животните, намерени мъртви, и изолиране или умъртвяване на слабите или умиращите животни.

Наблюденията следва да включват: промени в козината, третираната кожа, очите и лигавиците, както и на дихателната, кръвоносната, автономната и централната нервна система, соматомоторната активност и поведението на животните. Особено внимание следва да се обръща за тремори, конвулсии, слюноотделяне, диария, летаргия, сън и кома. Времето на смъртта се записва колкото е възможно по-точно. Животните, умрели по време на изпитването, както и оцелелите до края на изпитването се подлагат на аутопсия. Записват се всички видими патологични изменения. Когато е необходимо, някои тъкани се вземат за хистопатологично изследване.

Оценка на токсичното действие при другия пол

След приключването на опита с единия пол група от най-малко пет животни от другия пол също се подлага на третиране. Така може да се разбере дали животните от този пол не са забележимо по-чувствителни към изпитваното вещество. В отделни случаи е оправдано използването на по-малък брой животни. Когато има адекватна информация, показваща, че животните от изследвания пол са много по-чувствителни, то експериментирането с другия пол може и да не се прави.

2. ДАННИ

Данните се обобщават в табличен вид като за всяка група животни се показват: брой на животните в началото на изпитването, време на смъртта на всяко животно поотделно, брой животни с други признаци на токсично въздействие, описание на тосичните ефекти и находките при аутопсията. Индивидуалните телесни маси на животните се определят и записват непосредствено преди прилагането на изпитваното вещество, по един път на седмица след това и при смъртта. Когато времето на преживяване е по-голямо от един ден, измененията в теглото на животните се изчисляват и записват. Животните, убити по хуманни съображения заради стреса и болката, свързани с въздействието на веществото, се отчитат като случаи на смърт, причинена от веществото. Стойността на LD₅₀ следва да се определи по утвърдения метод.

Оценката на данните следва да включва преценка на зависимостта (ако има такава) между експозицията на животните и появата и остротата на всички аномалии, включително в поведението и клиничните аномалии, видимите поражения, промените в телесната маса, смъртността и всички останали токсикологични ефекти.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването следва по възможност да съдържа следната информация:

▼B

- вид, порода, източник, условия на средата, диета и т.н.;
- условия на изпитването (включително метод за почистване на кожата и вид на превръзката: оклузивна (запушваща) или неоклузивна);
- нива на дозите (с носителите, ако са използвани, и концентрациите);
- пол на третираните животни;
- таблични данни за отговора по пол и ниво на дозата (т.е. брой на животните, умрели или убити по време на опита; брой на животните със симптоми на токсично действие; общ брой на животните);
- време на смъртта след дозирането; причини и критерии за умъртвяването на животни по хуманни съображения;
- всички наблюдения;
- стойност на LD_{50} за пола, подложен на цялостно изследване, определена на четиринадесетия ден, и метод на определянето ѝ;
- 95 % интервал на достоверност за LD_{50} (където може да се предостави);
- крива доза/смъртност и наклон на кривата (където методът позволява да се определи);
- находки при аутопсията;
- всички хистопатологични находки;
- резултатите от всички направени изпитвания върху другия пол;
- обсъждане на резултатите (особено внимание се обръща на ефекта, който умъртвяването на животните по хуманни съображения по време на изпитването оказва върху изчислената стойност на LD_{50});
- интерпретиране на резултатите.

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ

Вж. Общо въведение, част Б, буква Г.

4. ПРЕПРАТКИ

Вж. Общо въведение, част Б, буква Д.

▼B**Б.4. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ: КОЖНО ДРАЗНЕЩО/КОРОЗИВНО ДЕЙСТВИЕ****1. МЕТОД**

Този метод е еквивалентен на метод OECD TG 404 (2002).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

При подготовката на този осъвременен метод специално внимание беше обърнато на възможностите за усъвършенстване във връзка с осигуряване хуманно отношение към опитните животни и с цялостната оценка на съществуващата информация за изпитваното вещество с цел избягване на ненужно изпитване върху опитни животни. При този метод се препоръчва, преди да се пристъпи към теста *in vivo* за оценка на корозивно/дразнещо действие на веществото, да се извърши анализ на съществуващите данни за химичното вещество, които имат отношение към това действие. Когато липсват достатъчно данни, те могат да се получат чрез извършване на последващо проучване (1). Стратегията на изследване включва извършване на валидирани и утвърдени изследвания *in vitro* и е представена като приложение към този метод. Освен това се препоръчва, когато е възможно, при първоначалното изследване *in vivo* веществото да се прилага на животното в трите тестови приложения последователно, а не едновременно.

За целите и на научната стойност на проучването, и на хуманното отношение към животните следва да не се пристъпва към изпитване *in vivo*, преди да бъдат анализирани и оценени всички налични данни във връзка с потенциалното корозивно/дразнещо действие на веществото върху кожата. Тези данни включват доказателства от съществуващи проучвания върху хора и/или лабораторни животни, сведения за корозивно/дразнещо действие на едно или повече вещества с подобен химичен строеж или смеси от такива вещества, данните за висока киселинност или алкалност на веществото (2)(3), както и резултатите от валидирани и утвърдени изследвания *in vivo* или *ex vivo* (4)(5)(5a). Този анализ следва да доведе до намаляване на необходимостта от извършване на изследвания *in vivo* за оценка на дразнещо/корозивно действие на веществата върху кожата, за които вече съществуват достатъчно данни от други проучвания относно тези ефекти.

Като приложение към този метод е изложена препоръчителна стратегия за последователно изпитване, която включва извършването на валидирани и утвърдени *in vitro* или *ex vivo* изпитвания за оценка на корозивно/дразнещо действие. Стратегията е разработена и единодушно препоръчана от участниците в семинар на OECD (6) и е приета като препоръчителна стратегия за изпитване в рамките на Глобалната система за хармонизиране на класификацията на химични вещества (GHS) (7). Препоръчва се тази стратегия да бъде приложена, преди да се предприеме *in vivo* изпитване. За нови вещества стратегията представлява препоръчителният подход за поетапно изпитване с цел получаване на достоверни научни данни за корозивното или дразнещото действие на веществото. За съществуващи вещества с недостатъчно данни за корозивно/дразнещо действие върху кожата стратегията следва да се прилага, когато се провеждат проучвания, за да се получат липсващите данни. Използването на друга стратегия или процедура за изпитване или решението да не се прилага поетапен подход за изпитване следва да бъдат обосновани.

Когато оценката за корозивно/дразнещо действие не може да бъде извършена чрез анализ на данните в съответствие със стратегията за последователно изпитване, следва да се пристъпи към *in vivo* изпитване (вж. приложението).

▼ B

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Кожно дразнене е предизвикването на обратимо увреждане на кожата след прилагането на дадено химично вещество за период до 4 часа.

Корозивно действие върху кожата е предизвикването на необратимо увреждане на кожата, а именно видима некроза на епидермиса и дермата след прилагането на дадено химично вещество за период до 4 часа. Характерните прояви на корозивно действие включват язви, кървене, а до края на 14-дневния период на наблюдение се появяват промени в цвета на кожата, области с пълна алопеция и цикатрикси. При съмнение за вида на увреждането следва да се извърши хистопатологично изследване.

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Изпитваното вещество се прилага еднократно върху кожата на опитно животно. Участък от кожата на животното, който не е третиран, служи като контрола. През определени интервали от време се отчита и оценява степента на дразнещо/корозивно действие. Наблюдаваните ефекти се описват подробно, за да може да се извърши цялостната им оценка. Продължителността на наблюдението следва да бъде достатъчно голяма, за да може да се установи дали ефектите са обратими или не.

Животните, които показват трайни признаци на тежък стрес и/или болка, следва да бъдат умъртвени по хуманен начин и тези ефекти да се вземат под внимание при оценката на веществото. Критериите за вземане на решение за умъртвяване по хуманен начин на животните, които изпитват тежко страдание и са в терминално състояние, са посочени в препратка (8).

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

1.4.1. Подготовка на *in vivo* изпитването

1.4.1.1. Избор на вида опитни животни

Предпочитаният вид опитни животни са зайците албиноси. Използват се млади, здрави, полово зрели животни. Използването на други животински видове следва да бъде обосновано.

1.4.1.2. Подготовка на животните

Приблизително 24 часа преди изпитването козината от дорзалната част на тялото на животните се отстранява чрез подстригване или бръснене. При подстригването или бръсненето кожата не следва да се охлузва. Използват се само животни без наранявания или заболявания на кожата.

В козината на някои породи зайци има гъсто окосмени участъци, които са по-забележими през определени периоди от годината. Изпитваните вещества следва да не се прилагат върху участъците с гъсто окосмяване.

1.4.1.3. Условия на отглеждане и хранене

Животните следва да бъдат разпределени в отделни клетки. В помещението на зайците следва да се поддържа температура 20 °C (± 3 °C). Стойностите на относителната влажност не следва да бъдат по-ниски от 30 % и е желателно да не превишават 70 % освен при почистване на помещението. Целта следва да бъде относителната влажност да се поддържа в интервала 50—60 %. Осветлението следва да бъде изкуствено, като се редуват 12 часа светлина и 12 часа тъмнина. При храненето се прилагат обичайните лабораторни диети с неограничен достъп до питейна вода.

▼B

1.4.2. Процедура на изпитването

1.4.2.1. Прилагане на изпитваното вещество

Изпитваното вещество се нанася върху малък участък от кожата (около 6 cm) и се покрива с марля. Марлята се прикрепва с помощта на лепенка, която не предизвиква дразнене на кожата. Когато не е възможно директно третиране (напр. при течности или някои пастообразни вещества), изпитваното вещество се нанася първо върху марлята, след което марлята се поставя върху кожата. През периода на експозиция марлята следва да се задържи в контакт с кожата, без да е притисната силно, с помощта на подходяща полуоклузивна превръзка. Когато изпитваното вещество се нанася върху марлята, тя следва да бъде прикрепена към кожата по такъв начин, че да се осигури плътен контакт и равномерно разпределение на веществото върху третирания участък. Достъпът на животното до марлята и поглъщането или вдишването на изпитваното вещество следва да бъде предотвратен.

Течните вещества най-често се използват, без да се разреждат. Когато се изпитва твърдо вещество (което може да се стрие на прах, ако това е необходимо), то следва да се навлажни с възможно най-малкото количество вода (или, при нужда, друг подходящ носител), което е достатъчно, за да се постигне плътен контакт с кожата. Когато се използва друг носител освен водата, той следва да не оказва влияние върху кожното дразнене, предизвикано от изпитваното вещество, или влиянието му следва да бъде минимално.

В края на периода на експозиция (обикновено 4 часа) остатъкът от веществото се отстранява от кожата, когато това е възможно, с вода или подходящ разтворител, без да се променя видът на кожната реакция или да се нарушава целостта на епидермиса.

1.4.2.2. Дози

Върху кожния участък се нанасят 0,5 ml от течни химични вещества или 0,5 g от твърди или пастообразни химични вещества.

1.4.2.3. Първоначално изпитване (*in vivo* изпитване за дразнещо/корозивно действие върху кожата с използване на едно опитно животно).

Препоръчва се *in vivo* изпитването да се извърши първоначално върху едно опитно животно, особено в случаите, когато се предполага, че веществото проявява корозивно действие. Този подход е в съответствие със стратегията за последователно изпитване (вж. приложение 1).

Когато въз основа на анализа на съществуващите данни се прецени, че веществото проявява корозивно действие, не е необходимо по-нататък то да се изпитва върху лабораторни животни. За повечето химични вещества, за които се предполага, че са корозивни, най-често не е необходимо да се извършва *in vivo* изпитване. Въпреки това в случаите, когато се прецени, че са необходими допълнителни данни поради недостатъчни доказателства, може да се извърши изпитване върху животни в ограничен обем, като се използва следният подход: веществото се прилага върху едно и също животно последователно до 3 пъти. Първия път превръзката и марлята се отстраняват след три минути. Ако не се наблюдава значителна кожна реакция, веществото се прилага втори път за един час. Ако наблюденията на този етап показват, че експозицията може да продължи 4 часа, като се спази принципът за хуманно отношение към животните, веществото се нанася трети път за четири часа, след което се оценява степента на реакцията.

Когато след една от трите последователни апликации се открие корозивен ефект, изпитването се прекратява веднага. Когато след нито една от апликациите не се наблюдава корозивен ефект, опитното животно се проследява в продължение на 14 дни, освен ако на по-ранен етап не се появят корозивни промени.

▼ B

В случаите, когато не се очаква изпитваното вещество да прояви корозивно действие, но може да предизвика дразнене, третирането се провежда върху едно животно с една апликация за четири часа.

1.4.2.4. *Потвърдително изпитване (in vivo изпитване за кожно дразнещо действие с използване на допълнителни опитни животни).*

Когато при първоначалното изпитване не се установява корозивен ефект, наблюдаваните прояви на дразнене или отрицателната реакция следва да бъдат потвърдени, като се извърши еднократно третиране на най-много две допълнителни животни за 4 часа. Ако при първоначалното изпитване са отчетени прояви на дразнене, потвърдителното изпитване може да се извърши последователно с използване на едно или две опитни животни или едновременно върху двете опитни животни. Когато по изключение не е проведено първоначално изпитване, могат да се третират две или три животни, като на всяко животно се прави по една апликация за 4 часа. Когато се използват две животни и при двете се наблюдава една и съща реакция, не е необходимо по-нататъшно продължаване на изпитването. В обратния случай се третира и трето допълнително животно. При получаване на противоречиви резултати може да се наложи използването на още допълнителни животни.

1.4.2.5. *Период на наблюдение*

Продължителността на периода на наблюдение следва да бъде достатъчна за пълната оценка на обратимостта на наблюдаваните ефекти. Въпреки това изпитването следва да се прекрати във всеки момент, когато животните покажат трайни признаци на силна болка или стрес. Обикновено за да се установи дали ефектите са обратими, животните се наблюдават в продължение на 14 дни след прекратяване на експозицията. Ако преди края на 14-дневния период се установи, че промените са обратими, изпитването се прекратява в момента, когато това е установено.

1.4.2.6. *Клинични наблюдения и оценка на кожните реакции*

Всички животни се преглеждат за признаци на еритема и едем и реакциите се оценяват 60 минути, а след това 24, 48 и 72 часа след прекратяването на експозицията. При първоначалното изпитване върху едно животно третираният участък се преглежда и веднага след отстраняването на превръзката и марлята. Кожните промени се класифицират и отчитат според скалата, дадена в таблица 1. Когато до 72-рия час не може да се определи дали настъпило увреждане на кожата е проява на дразнещо или корозивно действие, наблюдението продължава до 14-ия ден, за да се оцени дали промените са обратими. Освен признаците на дразнене следва да се опишат подробно и всички локални токсични прояви (напр. изсушаване на кожата) и системни неблагоприятни ефекти (напр. клинични симптоми на отравяне, промени в телесната маса). Когато е необходимо да се изяснят противоречиви резултати, следва да се използва хистопатологично изследване.

Класифицирането на кожните промени е субективен процес. За да се постигне съответствие в оценките при класифицирането на кожните промени и да се подпомогнат лабораториите, в които се провеждат изпитвания, и лицата, които наблюдават животните и оценяват намерените промени, персоналът, извършващ наблюдението, е необходимо да бъде добре обучен да прилага класификационната скала (вж. таблицата по-долу). Може да се използва и илюстрирано ръководство за класифициране на проявите на кожно дразнене и други увреждания (9).

2. ДАННИ

2.1. ПРЕДСТАВЯНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

В отчета за изпитването получените резултати следва да се обобщат в табличен вид. Той следва да включва всички данни, посочени в точка 3.1.

▼B

2.2. ОЦЕНКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Баловата оценка на кожното дразнене следва да се разглежда във връзка с вида, тежестта и обратимостта или необратимостта на уврежданията. Индивидуалната балова оценка не е единственият критерий за определяне на дразнещите свойства на изпитваното вещество, тъй като се оценяват и други ефекти на веществото. Вместо това индивидуалният бал следва да се разглежда като стойност, която се оценява съвместно с всички други наблюдения от проучването.

При оценката на дразнещия ефект следва да се има предвид дали кожните увреждания са обратими или не. Когато промени като алоpecia (в ограничени участъци), хиперкератоза, хиперплазия и излющване на кожата се задържат до края на 14-дневния период на наблюдение, изпитваното вещество следва да се класифицира като дразнещо.

3. ДОКЛАДВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

3.1. ОТЧЕТ ЗА ИЗПИТВАНЕТО

Отчетът за изпитването следва да включва следната информация:

Обосновка за провеждане на *in vivo* изпитване: резултати от анализа на съществуващите данни, включително резултатите от прилагането на стратегията за последователно изпитване:

- описание на съответните данни от предишни изпитвания;
- данни, получени при всеки етап от стратегията за изпитване;
- описание на извършените *in vitro* изпитвания, включително подробно представяне на процедурите на изпитване и резултатите за изпитваните и референтните химични вещества;
- анализ на съществуващите данни с оглед преценка на необходимостта от извършване на *in vivo* проучване.

Изпитвано вещество:

- данни за идентифициране на химичното вещество (напр. CAS номер, източник, чистота, известни примеси, номер на партидата);
- физична природа и физикохимични свойства (напр. рН, летливост, разтворимост, стабилност);
- при изпитване на смеси се представят данни за качествения състав на сместа и процентното съдържание на компонентите ѝ.

Носител (ексципиент):

- химично идентифициране, концентрация (където е необходимо), използван обем;
- обосновка за избора на носителя.

Опитни животни:

- използван вид/порода, обосновка за използване на други животински видове/породи освен зайци албиноси;
- брой на животните от всеки пол;
- индивидуална телесна маса на всяко животно в началото и в края на изпитването;
- възраст на животните в началото на проучването;
- източник за доставка на животните, условия на отглеждане, диета и т.н.

▼B

Условия на изпитването:

- начин за подготовка на кожния участък за третиране;
- описание на материалите, използвани при апликацията на веществото и приготвянето на превръзката, и на начина на поставяне на превръзката;
- описание на подготовката на изпитваното вещество за нанасяне и на нанасянето и отстраняването му.

Резултати:

- таблица с баловите оценки на проявите на дразнещо/корозивно действие за всяко животно във всички моменти на отчитане;
- описание на всички наблюдавани увреждания;
- описание в разказна форма на вида и степента на наблюдаваните прояви на дразнене/корозивно действие, както и на хистопатологичните заключения;
- описание на други неблагоприятни локални (напр. отстраняване на мазнините на кожата) и системни ефекти освен проявите на кожно дразнене и корозивно действие.

Обсъждане на резултатите.

4.

ПРЕПРАТКИ

- (1) Barratt, M. D., Castell, J. V., Chamberlain, M., Combes, R. D., Dearden, J. C., Fentem, J. H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T. J. B., Livingston, D. J., Provan, W. M., Rutten, F. A. J. J. L., Verhaar, H. J. M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410—429.
- (2) Young, J. R., How, M. J., Walker, A. P., Worth W. M. H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19—26.
- (3) Worth, A. P., Fentem, J. H., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709—720.
- (4) ECETOC (1990) Monograph №.15, „Skin Irritation“, European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.
- (5) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhutter, H. G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, pp.483—524.
- (5a) Testing Method B.40 Skin Corrosion.
- (6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22—24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).

▼B

- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment №.19 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

[Може да се получи от секретариата на OECD].

▼B

Таблица I

СКАЛА НА КОЖНИТЕ ПРОМЕНИ**Образуване на еритема и есхара**

Отсъствие на еритема	0
Много слаба еритема (едва забележима)	1
Добре изразена еритема	2
Умерена до тежка еритема	3
Тежка еритема (силно зачервяване — с цвят на цвекло) до образуване на есхара, което не позволява да се отчете балът на еритемата	4

Максимален бал — 4

Образуване на едем

Отсъствие на едем	0
Много слаб едем (едва забележим)	1
Лек едем (границите на едемния участък са видимо повдигнати и се очертават ясно)	2
Умерено изразен едем (подуване около 1 мм)	3
Тежък едем (подуване повече от 1 мм, което обхваща участък, по-голям от третирания)	4

Максимален бал — 4

Когато е необходимо да се изяснят противоречиви резултати, може да се проведе хистопатологично изследване.



ПРИЛОЖЕНИЕ

Стратегия за последователно изпитване за оценка на дразнещо/корозивнодействие върху кожата

ОБЩИ СЪОБРАЖЕНИЯ

В интерес на научната стойност на проучването и на хуманното отношение към животните е важно да се избягва ненужното използване на опитни животни и да се допускат колкото е възможно по-малко изпитвания, за които се очаква, че ще предизвикат тежки увреждания. Преди да се пристъпи към *in vivo* изпитвания, следва да се оцени цялата съществуваща информация по отношение на дразнещия/корозивния потенциал на дадено химично вещество за кожата. Възможно е вече да съществуват достатъчно данни, въз основа на които веществото може да се класифицира по отношение на кожно дразнещо/корозивно действие, без да е необходимо да се извършват изпитвания върху лабораторни животни. Затова чрез анализа на съществуващите данни и стратегията за последователно изпитване се свежда до минимум необходимостта от *in vivo* изпитвания, особено когато се очаква, че химичното вещество ще предизвика тежки увреждания у животните.

Препоръчва се да се извърши анализ на съществуващите данни за кожното дразнещо и корозивно действие на химичното вещество, за да се прецени дали да се проведат други проучвания освен *in vivo* дермалните изпитвания, които могат да подпомогнат оценката на дразнещия/корозивния потенциал. Когато се прецени, че са нужни по-нататъшни проучвания, се препоръчва необходимите експериментални данни да се получат, като се приложи стратегията за последователно изпитване. За химични вещества, които не са изпитвани досега, стратегията за последователно изпитване следва да се използва, за да се съберат всички данни, необходими за оценката на дразнещия/корозивния ефект върху кожата. Стратегията за изпитване, изложена в настоящото приложение, е разработена на семинар на OECD (1) и по-късно е утвърдена и разширена в рамките на Хармонизираната интегрирана система за класифициране на опасностите във връзка с ефектите на химичните вещества върху човешкото здраве и околната среда, приета на 28-ата съвместна среща на Комитета по химикалите и работната група по химикалите през ноември 1998 г. (2).

Въпреки че стратегията за последователно изпитване не е включена като неразделна част от метод Б.4, тя представлява препоръчителният подход за оценка на дразнещия и корозивния ефект върху кожата. Този подход съответства в най-висока степен на критериите за добра практика и етика при *in vivo* изпитванията за оценка на кожното дразнещо и корозивно действие. В представения метод са дадени указания за провеждането на *in vivo* изпитването и се обобщават факторите, които следва да се вземат предвид, преди да се пристъпи към него. Стратегията предлага подход за оценка на съществуващите данни за кожното дразнещо/корозивно действие на химичните вещества и поэтапен подход за получаване на необходимите данни за веществата, които досега не са били изследвани или за които са необходими допълнителни проучвания. В нея също се препоръчва при определени условия извършването на валидирани и утвърдени *in vitro* или *ex vivo* методи за оценка на кожно корозивно/дразнещо действие.

ОПИСАНИЕ НА СТРАТЕГИЯТА ЗА ОЦЕНКА И ИЗПИТВАНЕ

Преди да се предприемат изпитвания в рамките на стратегията за последователно изпитване (вж. фигурата), следва да се прецени цялата налична информация, за да се определи необходимостта от провеждане на *in vivo* дермално изпитване. Въпреки че при оценката на отделни параметри (например много високи или ниски стойности на рН) може да се получи съществена информация, следва да се разгледат всички съществуващи данни. Всички сведения за ефектите на дадено вещество или негови структурни аналози следва да бъдат оценени в процеса на вземане на решение и да се представи обосновката на взетото решение. На първо място следва да се обърне внимание на съществуващите данни за ефектите върху хора и животни, а след това да се оценят резултатите от *in vitro* или *ex vivo* изпитвания. Във всички случаи, когато е възможно, следва да се избягва провеждането на *in vivo* изпитвания на корозивни химични вещества. Факторите, които се вземат под внимание в стратегията на изпитване, включват:

▼ B

Оценка на съществуващите данни за хора и животни (стъпка 1). Съществуващите данни за хора, като например данни от клинични проучвания, проучвания върху работници, описания на случаи и/или данни от изпитвания върху животни, например от проучвания на острата дермална токсичност или дермалната токсичност при многократно постъпване, следва да се разглеждат с предимство, защото те осигуряват информация, пряко свързана с ефектите върху кожата. Не е необходимо да се провеждат *in vivo* изпитвания на вещества с известно дразнещо или корозивно действие, както и на тези, при които данните убедително показват отсъствие на дразнещ или корозивен ефект.

Анализ на зависимостите „структура-активност“ (structure activity relationships, SAR) (стъпка 2). Резултатите от изпитвания на вещества с подобна химична структура следва да се вземат под внимание, ако са налице такива данни. Когато съществуват достатъчно данни за хора и/или животни, свидетелстващи за дермално дразнещо/корозивно действие на химични вещества с аналогична структура или смеси от такива вещества, може да се приеме, че веществото, което подлежи на проучване, ще предизвика същия ефект. В тези случаи може да се прецени, че не е необходимо да се провежда изпитване. Съгласно стратегията за последователно изпитване негативните данни от проучвания на химични вещества с аналогична структура или смеси от такива вещества не се смятат като достатъчно основание, за да се приеме отсъствие на корозивен или дразнещ ефект за дадено химично вещество. За установяване на потенциално корозивно/дразнещо действие върху кожата, следва да се използват валидирани и утвърдени SAR подходи.

Физикохимични свойства и химична активност (стъпка 3). Химични вещества с много високо или много ниско рН ($\text{pH} \geq 11,5$ или $\text{pH} \leq 2,0$) могат да предизвикат силно изразени локални ефекти. Когато дадено химично вещество може да се определи като корозивно за кожата въз основа на високо или ниско рН, следва да се вземе под внимание и неговият алкално-киселинен резерв (или буферен капацитет) (3)(4). Когато данните за буферния капацитет показват, че веществото може да не е корозивно за кожата, следва да се проведе по-нататъшно проучване за потвърждаване на това предположение, за предпочитане посредством валидирано и утвърдено *in vitro* или *ex vivo* изпитване (вж. стъпки 5 и 6).

Дермална токсичност (стъпка 4). Когато е доказано, че дадено химично вещество проявява висока токсичност по дермален път на постъпване, провеждането на *in vivo* изпитване за кожно дразнещо/корозивно действие може да бъде практически невъзможно, тъй като количеството от изпитваното вещество, което обикновено се прилага, може да надвиши дозите, водещи до изразена токсичност или леталитет, и вследствие на това изпитването да доведе до смърт или тежко страдание на опитните животни. В допълнение, когато са извършени проучвания на дермалната токсичност върху зайци албиноси с лимитираща доза 2 000 mg/kg т. т. или по-високи дози и при тях не е установено кожно дразнене или корозивен ефект, може да се прецени, че не е необходимо да се провежда по-нататъшно изпитване за кожно дразнещо/корозивно действие. Когато острата дермална токсичност се оценява въз основа на извършени в миналото проучвания, следва да се имат предвид редица съображения. Например представените данни за кожни увреждания могат да бъдат непълни. Изпитването и наблюденията може да са извършени не върху зайци, а върху друг животински вид, който се различава значително по своята чувствителност към веществото. Също така формата, в която изпитваното вещество е приложено на животните, може да не е избрана подходящо с оглед оценката на кожно дразнещо/корозивно действие (например при оценката на дермалната токсичност веществата се използват често в разрежено състояние (5)). Въпреки това, в случаите, когато са налице адекватно планирани и проведени проучвания на дермалната токсичност върху зайци, отрицателните резултати могат да се смятат като достатъчно доказателство за това, че веществото не проявява корозивно или дразнещо действие.

*Резултати от *in vitro* или *ex vivo* изпитвания (стъпки 5 и 6).* Химични вещества, които проявяват корозивни или силно изразени дразнещи свойства при валидирано и утвърдено *in vitro* или *ex vivo* изпитване за оценка на тези специфични ефекти (6)(7), не е необходимо да се изпитват върху животни. Може да се приеме, че тези вещества ще предизвикат подобни силно изразени ефекти *in vivo*.

▼B

In vivo изпитване върху зайци (стъпки 7 и 8). Когато е взето решение за провеждане на *in vivo* изпитване, то следва да започне с третиране на едно животно. Когато резултатите от третирането показват, че веществото е корозивно за кожата, по-нататъшно изпитване не следва да се извършва. Ако при първоначалното изпитване не се наблюдава корозивен ефект, дразнещият ефект или негативният резултат следва да се потвърди, като се третира най-много две допълнителни животни при 4-часова експозиция. Когато при първоначалното изпитване се наблюдава дразнещо действие, изпитването за потвърждение на резултата може да се извърши последователно (върху едно животно и при необходимост — върху второ животно) или едновременно върху две животни.

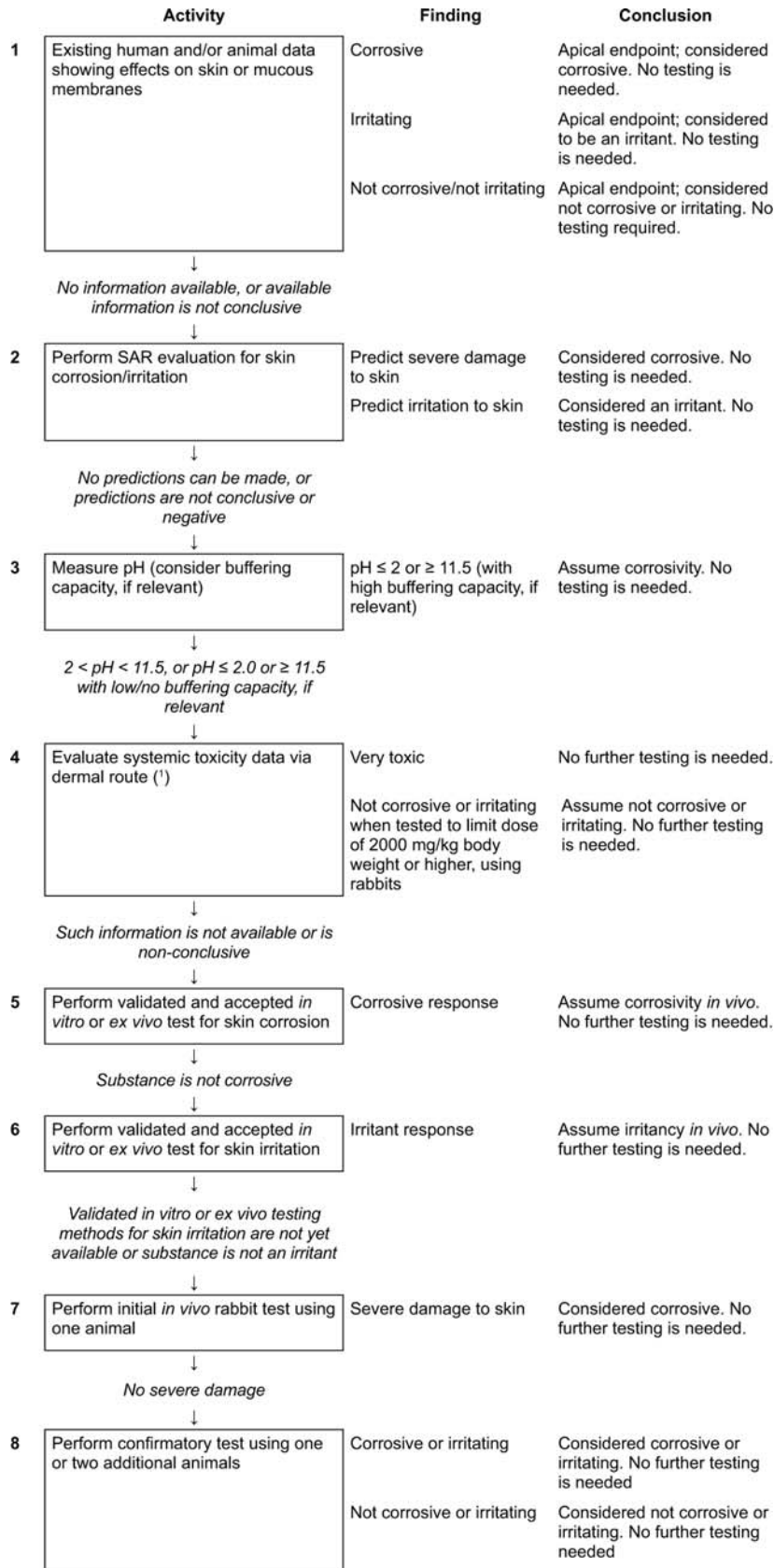
ПРЕПРАТКИ

- (1) OECD (1996) Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22—24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A. P., Fentem J. H., Balls M., Botham P. A., Curren R. D., Earl L. K., Esdail D. J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* 26, 709—720.
- (4) Young, J. R., How, M. J., Walker, A. P., Worth, W. M. H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. *Toxic. In Vitro*, 2 (1) pp. 19—26.
- (5) Patil, S. M., Patrick, E., Maibach, H. I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): *Dermatotoxicology*. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, 411—436.
- (6) Testing Method B.40.
- (7) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Edsail, D. J., Holzhutter, H. G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, pp.483—524.



Фигура

СТРАТЕГИЯ ЗА ИЗПИТВАНЕ И ОЦЕНКА НА ДРАЗНЕЩО/КОРОЗИВНОДЕЙСТВИЕ
ВЪРХУ КОЖАТА



(1) can be considered before Steps 2 and 3.

▼ M7

Б.5. ОСТРО ДРАЗНЕЩО/КОРОЗИВНО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ ОЧИТЕ

ВЪВЕДЕНИЕ

Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 405 (2012). Насоките за изпитване на ОИСП за изпитването на химикали се преразглеждат периодично, за да се гарантира, че отразяват възможно най-добрите налични научни постижения. При предходни преразглеждания на посочените насоки за изпитване специално внимание е отделено на възможностите за усъвършенстване на метода посредством оценка на цялата съществуваща информация за изпитвания химикал с оглед избягване на ненужно изпитване върху лабораторни животни, като по този начин се отделя внимание на опасенията във връзка с хуманното отношение към животните. В TG 405 (приети през 1981 г. и актуализирани през 1987 г., 2002 г., и 2012 г.) се съдържа препоръка преди да се пристъпи към изпитване *in vivo* за остро дразнещо/корозивно действие върху очите, да се извърши основан на тежестта на доказателствата анализ (1) на относимите налични данни. Когато липсват достатъчно данни, се препоръчва те да бъдат получени чрез извършване на последователно изпитване (2)(3). Стратегията за изпитването включва извършването на валидирани и приети изпитвания *in vitro* и е изложена като приложение към настоящия метод за изпитване. За целите на Регламент (ЕО) № 1907/2006 относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH) (1), в относимите насоки на ЕСНА (21) е включена също и интегрираната стратегия за изпитване. Изпитването на животни трябва да се извършва само ако това е определено за необходимо след разглеждане на съществуващите алтернативни методи и използването на тези, които са определени като подходящи. Към момента на изготвяне на настоящия актуализиран метод за изпитване съществуват ситуации, при които използването на този метод е все още необходимо или изисквано по силата на някои нормативни уредби.

Последната актуализация е съсредоточена главно върху използването на аналгетици и анестетици, без да се засяга основната концепция и структурата на насоката за изпитванията. Междуведомственият координационен комитет за валидиране на алтернативни методи (ICCVAM) (2) и независима международна научна група за партньорска оценка преразгледаха ползата и ограниченията при обичайното използване на местни анестетици, общи аналгетици и хуманен край по време на *in vivo* изпитванията за безопасност при дразнене на очите (12). Заключение от прегледа е, че използването на местни анестетици и общи аналгетици би могло да доведе до избягване на повечето или всички болки и дистрес, без това да засяга резултата от изпитването, и в него се препоръчва използването на тези вещества във всички случаи. Настоящият метод за изпитване взема този преглед под внимание. Местните анестетици, общите аналгетици и хуманният край следва редовно да бъдат използвани по време на изпитванията *in vivo* за остро дразнещо и корозивно действие върху очите. Изключенията, при които те не се използват, следва да бъдат обосновани. Облекченията, описани в настоящия метод, ще доведат до значително намаляване или избягване на болката и дистреса при животните в повечето случаи, при които все още са необходими изпитвания *in vivo* за безопасност при дразнене на очите.

Балансираното изпреварващо овладяване на болката следва да включва i) обичайно предварително третиране с местен анестетик (напр. пропаракаин или тетракаин) и общ аналгетик (напр. бупренорфин), ii) обичайно последващо третиране с общи аналгетици (напр. бупренорфин и мелоксикам), iii) планирано наблюдение, мониторинг и регистриране на клинични признаци на болка и/или дистрес при животни, и iv) планирано наблюдение, мониторинг и регистриране на естеството, тежестта и развитието на всички наранявания на очите. По-подробна информация е дадена в актуализираните процедури, описани по-долу. След прилагането на изпитвания химикал следва да не се прилагат допълнителни местни анестетици или аналгетици с цел да се избегне пречене на изследването.

(1) 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 304, 22.11.2007 г., стр. 1.

(2) Междуведомственият координационен комитет за валидиране на алтернативни методи на САЩ

▼ M7

Аналгетиците с противовъзпалително действие (напр. мелоксикам) не следва да се прилагат локално и дозите за системно приложение не следва да оказват влияние на ефектите върху очите.

Определенията са дадени в допълнението към метода за изпитване.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

В интерес на научната стойност на проучването и на хуманното отношение към животните е да не се разглежда провеждането на изпитване *in vivo* преди да бъдат оценени в основан на тежестта на доказателствата анализ всички налични данни, относими към потенциалното корозивно/дразнещо действие на химикала върху очите. Такива данни включват доказателства от съществуващи проучвания върху хора и/или лабораторни животни, доказателства за корозивно/дразнещо действие на едно или повече структурно подобни вещества или смеси от такива вещества, данни, доказващи висока киселинност или алкалност на химикала (4) (5), както и резултати от валидирани и приети изпитвания *in vitro* или *ex vivo* за корозивно действие върху кожата и корозивно/дразнещо действие върху очите (6) (13) (14) (15) (16) (17). Проучванията могат да бъдат извършени преди основан на тежестта на доказателствата анализ или в резултат от този анализ.

За някои химикали такъв анализ може да покаже необходимост от изследване *in vivo* за потенциала на химикала за корозивно/дразнещо действие върху очите. Във всички такива случаи, преди да се разгледа провеждане на изпитване *in vivo*, се препоръчва да се извърши проучване за корозивно действие на химикала върху кожата *in vitro* и/или *in vivo* и да бъде направена оценка в съответствие със стратегията за последователно изпитване в метод за изпитване Б.4 (7) или с интегрираната стратегия за изпитване, описани в насоките на ЕСНА (21).

Стратегия за последователно изпитване, която включва прилагането на валидирани *in vitro* или *ex vivo* изпитвания за корозивно/дразнещо действие върху очите, е включена като допълнение към настоящия метод за изпитване и, за целите на REACH, в насоките на ЕСНА (21). Препоръчва се такава стратегия за изпитване да се приложи преди започването на изпитване *in vivo*. За нови химикали се препоръчва подход за поетапно изпитване с цел получаване на достоверни научни данни за корозивното/дразнещо действие на химикала. За съществуващи химикали с недостатъчно данни за корозивно/дразнещо действие върху очите и кожата стратегията може да се приложи, за да се получат липсващите данни. Използването на друга стратегия или процедура за изпитване или решението да не се прилага поетапен подход за изпитване следва да бъдат обосновани.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО *IN VIVO*

След предварителното третиране с общ аналгетик и индукцията в подходяща местна анестезия химикалът, предназначен за изпитване, се прилага в единична доза върху едно от очите на опитното животно; нетретираното око служи за контрола. През определени интервали от време се отчита и оценява степента на дразнещо/корозивно действие върху конюнктивата, роговицата и ириса. Другите ефекти върху очите, както и неблагоприятните системни ефекти също се описват с оглед извършването на цялостна оценка на токсичното действие. Продължителността на наблюдението следва да бъде достатъчно голяма, за да може да направи оценка дали ефектите са обратими, или не.

Животните, показващи признаци на тежък стрес и/или болка в който и да е момент от изпитването, или лезии, които съответстват на хуманния край, описан в настоящия метод за изпитване (вж. точка 26), следва да бъдат умъртвени по хуманен начин и химикалът следва да бъде оценен по съответния начин. Критериите за вземане на решение за умъртвяване по хуманен начин на животните в терминално състояние и тези, които изпитват тежко страдание, са предмет на ръководство на ОИСР (8).

▼ **M7****ПОДГОТОВКА НА ИЗПИТВАНЕТО *IN VIVO*****Избор на видове**

Предпочитаните опитни животни са зайците албиноси, като се използват млади, здрави, полово зрели животни. Използването на други животински породи или видове следва да бъде обосновано.

Подготовка на животните

Двете очи на всяко експериментално животно, което е избрано за евентуално включване в изпитването, следва да се прегледат през последните 24 часа преди началото му. Животните, при които се установяват признаци на очно дразнене, очни дефекти или предшествашо увреждане на роговицата, не следва да се използват.

Условия на отглеждане и хранене

Животните трябва да бъдат индивидуално настанени. В опитното помещение, в което се намират зайците, следва да се поддържа температура 20°C (\pm 3°C). Въпреки че относителната влажност следва да бъде поне 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. Прекомерният светлинен интензитет трябва да се избягва. При храненето могат да се прилагат обичайните лабораторни диети, с неограничен достъп до питейна вода.

ПРОЦЕДУРА ЗА ИЗПИТВАНЕ**Използване на местни анестетици и общи аналгетици**

За да се избегнат или да се сведат до минимум болката и дистреса при изпитванията за безопасност за очите се препоръчват следните процедури. Алтернативни процедури, за които е определено, че водят до избягване или облекчаване на болката и дистреса в същата или в по-голяма степен, могат да бъдат използвани като заместващи.

- Шестдесет минути преди прилагането на изпитвания химикал се прилага 0,01 mg/kg бупренорфин чрез подкожно инжектиране, с цел осигуряване на терапевтично равнище на обща аналгезия. За бупренорфина и за други подобни опиоидни аналгетици с общо действие не е известно или не се очаква да доведат до изменения в резултатите, свързани с очите (12).
- Пет минути преди прилагането на изпитвания химикал към всяко око се прилагат една или две капки местен очен анестетик (например 0,5 % пропикаинхидрохлорид или 0,5 % тетракаинхидрохлорид). С цел да се предотврати евентуално пречене на проучването се препоръчва местен анестетик, който не съдържа консерванти. За всяко животно нетретираното с изпитван химикал око, което е третирано с местни анестетици, служи за контрола. Ако изпитваният химикал се очаква да причини значителна болка и дистрес, обикновено не следва да бъде изпитван *in vivo*. Независимо от това, в случай на съмнение или когато се налага провеждането на изпитване, следва да се обмислят допълнителни прилагания на местен анестетик на интервал от 5 минути преди прилагането на изпитвания химикал. Потребителите следва да имат предвид, че множество прилагания на местни анестетици биха могли да причинят леко увеличаване на тежестта и/или времето за изчезване на причинени по химичен път лезии.
- Осем часа след прилагането на изпитвания химикал, чрез подкожно инжектиране се прилагат 0,01 mg/kg бупренорфин и 0,5 mg/kg мелоксикам, за да се осигури продължаващо терапевтично равнище на обща аналгезия. Въпреки че няма данни, които да сочат, че мелоксикамът има противовъзпалително въздействие върху очите, когато се прилага чрез подкожно инжектиране веднъж дневно, мелоксикамът следва да не бъде прилаган, най-малко до 8 часа след прилагането на изпитвания химикал, за да се избегне всякакво възможно пречене на проучването (12).
- След първоначалния период от 8 часа след прилагането на изпитвания химикал 0,01 mg/kg бупренорфин се прилага чрез подкожно инжектиране веднъж на всеки 12 часа, заедно с 0,5 mg/kg мелоксикам чрез

▼ **M7**

подкожно инжектиране на всеки 24 часа, докато очните лезии изчезнат и не се наблюдават клинични признаци на болка и дистрес. Налични са препарати от аналгетици със забавено освобождаване, които биха могли да бъдат използвани, за да се намали честотата на дозиране с аналгетици.

- Ако превантивната или местната аналгезия са недостатъчни, след прилагането на изпитвания химикал следва незабавно да бъдат дадени „спасителни“ аналгетици. Ако животното показва признаци на болка и дистрес по време на изследването, незабавно се дава „спасителна доза“ от 0,03 mg/kg бупренорфин чрез подкожно инжектиране и, ако е необходимо, се повтаря веднъж на всеки 8 часа, вместо 0,01 mg/kg мелоксикам чрез подкожно инжектиране на всеки 12 часа. Мелоксикам 0,5 mg/kg се прилага чрез подкожно инжектиране на всеки 24 часа, заедно със „спасителната“ на доза бупренорфин, но не преди най-малко 8 часа след прилагането на изпитвания химикал.

Прилагане на изпитвания химикал

Изпитваният химикал следва да се постави в конюнктивалната торбичка на едното око на всяко от животните след леко издърпване на долния клепач по-напред от очната ябълка. След това двата клепача се държат долепени за около една секунда, за да се избегне загуба на материал. Другото око не се третира и служи за контрола.

Промиване

Очите на опитните животни не следва да се промиват в продължение най-малко на 24 часа след на капването на изпитвания химикал, освен в случаите, когато той е в твърдо агрегатно състояние (виж точка 18) и когато корозивният или дразнещият ефект се проявява непосредствено след третирането. Промивка може да се направи на 24-ия час след третирането, ако е необходимо.

Използването на сателитна група животни за изследване на влиянието на промивката не се препоръчва, освен ако не е научно обосновано. Ако е необходима сателитна група, следва да бъдат използвани два заека. Условиата на промиването следва да бъдат внимателно документирани, например дата и час на промиването; състав и температура на разтвора за промиване; продължителност, обем и скорост на прилагане.

Доза

1) Изпитване на течности

Когато се изпитват течности се използва доза от 0,1 ml. Не следва да се използват пулверизатори с помпа за поставяне на химикала директно върху окото. Течният спрей следва да се изпръска и да се събере в контейнер, след което от него се взема необходимото количество от 0,1 ml и се поставя в окото.

2) Изпитване на химикали в твърдо агрегатно състояние

Когато се изпитват химикали, които са в твърдо агрегатно състояние, пастообразни или под формата на частици, следва да се прилага количество с обем 0,1 ml или маса не повече от 100 mg. Химикалът, който се изпитва, следва да бъде стрит до фин прах. Обемът на твърдия материал следва да бъде измерен след леко уплътняване, например чрез почукване върху съда, в който се извършва измерването. Когато твърдият изпитван химикал не е бил отстранен от окото на изпитваното животно чрез физиологични механизми в първата времева точка на наблюдението (1 час след третирането), окото може да се изплакне с физиологичен разтвор или дестилирана вода.

3) Изпитване на аерозоли

Препоръчва се химикалът от всички пулверизатори с помпа или аерозоли да бъде събран в контейнер преди на капването в окото. Изключение се прави само за химикали в аерозолни флакони под налягане, които не могат бъдат събрани поради изпаряване. В такива случаи окото следва да се придържа отворено и изпитваният химикал се прилага директно върху предната му повърхност с едно изпръскване в продължение на около една секунда от разстояние 10 cm. Това разстояние може да варира в зависимост от налягането на аерозола и съдържанието му. Следва да се положи грижа окото да не бъде увредено от налягането на аерозола. В подходящи случаи може да бъде необходимо да се оцени потенциалът за „механично“ увреждане на окото от налягането на аерозола.

▼ **M7**

Оценка на дозата от аерозола може да бъде направена чрез симулиране на изпитването, както следва: химикалът се напръсква върху тегловна хартия през отвор с размерите на заешко око, разположен непосредствено пред хартията. Чрез разликата в теглото на хартията преди и след напръскването се определя приблизително количеството, напръскано върху окото. За летливи химикали дозата може да се оцени чрез претегляне на контейнер за химикала, който се претегля преди и след отстраняването на изпитвания химикал.

Първоначално изпитване (изпитване *in vivo* за дразнещо/корозивно действие с използване на едно животно)

Категорично се препоръчва *in vivo* изпитването да се извърши първоначално с използване на едно животно (вж. Допълнение към настоящия метод за изпитване: Стратегия за последователно изпитване за дразнещо и корозивно действие върху очите). Наблюденията трябва да дават възможност за определяне на тежестта и обратимостта преди да се пристъпи към потвърждаващо изпитване с второ животно.

Когато това изпитване се проведе съгласно описаната процедура и резултатите показват, че химикалът е с корозивно или силно дразнещо действие върху очите, не следва да се извършва по-нататъшно изпитване за дразнещо действие върху очите.

Потвърдително изпитване (изпитване *in vivo* за дразнещо действие върху очите с използване на допълнителни животни).

Когато при първоначалното изпитване не се наблюдава корозивно или силно дразнещо действие, дразнещият ефект или негативният отговор следва да се потвърдят, като се третират най-много две допълнителни животни. Ако при първоначалното изпитване се наблюдава дразнещо действие, се препоръчва потвърдителното изпитване да се извърши чрез последователно изпитване върху едно животно наведнъж, вместо едновременна експозиция на двете допълнителни животни. Ако при второто животно се наблюдава корозивно или силно дразнещо действие, изпитването не се продължава. Ако резултатите от второто животно са достатъчни, за да позволят определяне на класифицирането на опасността, тогава не следва да се извършва по-нататъшно изпитване.

Период на наблюдение

Продължителността на периода на наблюдение следва да бъде достатъчна за цялостната оценка на големината и обратимостта на наблюдаваните ефекти. Независимо от това, изпитването следва да се прекрати във всеки момент, в който опитното животно покаже признаци на силна болка или дистрес (8). Обикновено за да се установи дали ефектите са обратими, животните следва да се наблюдават в продължение на 21 дни след прилагането на изпитвания химикал. Ако обратимостта бъде установена преди края на 21-дневния период, изследването следва да се прекрати в момента на установяването.

Клинични наблюдения и степенуване на очните реакции

Очите следва да бъдат цялостно оценени за наличието или липсата на лезии върху очите един час след прилагането на изпитвания химикал, след което оценките трябва да са най-малко ежедневни. Животните следва да бъдат оценявани няколко пъти дневно в продължение на първите 3 дни, за да гарантира своевременно вземане на решенията за прекратяване. Изпитваните животни следва да бъдат редовно оценявани през цялото време на изследването за клинични признаци на болка и/или дистрес (напр. повтарящо се докосване с лапа или триене на окото, прекомерно мигане, прекомерно съзлене) (9) (10) (11), най-малко два пъти на ден, с минимум от 6 часа между наблюденията или по-често, ако е необходимо. Това е необходимо, за да се направи i) адекватна оценка на животните за признаци на болка и дистрес с цел вземане на информирани решения относно необходимостта от увеличаване на дозировката на аналгетици и ii) оценка на животните за доказателства за определен хуманен край с цел вземане на информирани решения за това дали е уместно умъртвяването на животни по хуманен начин, и за гарантиране, че тези решения се извършват своевременно. Обикновено следва да бъде използвано флуоресцеиново оцветяване, а когато се счита за целесъобразно се използва и биомикроскоп с шпалт-лампа (напр. при оценка на дълбочината на увреждането, когато е налице язва на роговицата) като помощно средство при откриването и измерването на увреждането на окото, за оценка на това дали са изпълнени установените критерии за умъртвяване на животни по хуманен начин. Могат да бъдат събирани цифрови снимки на наблюдаваните увреждания с цел позоваване

▼ **M7**

и осигуряване на непрекъснато записване на степента на увреждане на очите. Изпитването на животните не следва да продължава по-дълго от необходимото за получаване на окончателна информация. Животните, които показват признаци на силна болка или дистрес, следва да бъдат умъртвени незабавно по хуманен начин и химикалът следва да бъде оценен по съответния начин.

Животните със следните очни увреждания, настъпили след накапването, следва да бъдат умъртвени по хуманен начин (вж. таблица 1 за описание на степените на увреждане): перфорация на роговицата или значима язва на роговицата, включително стафилома; кръв в предната камера на окото; непрозрачност на роговицата, степен 4; отсъствие на реакция на светлината (промени в ириса от 2 степен), което персистира за 72 часа; язви на конюнктивата; некроза на конюнктивата или мигателните ципи; или лющене на мъртва тъкан. Това се налага, защото обикновено тези увреждания са необратими. Освен това се препоръчва следните очни увреждания да се използват като крайни точки за прекратяване на изследванията по хуманни съображения преди края на предвидения 21-дневен период на наблюдение. Тези увреждания се смятат за прогнозиращи по отношение на тежки наранявания в резултат от дразнещо или корозивно действие, или на наранявания, за които не се очаква да са напълно обратими до края на 21-дневния период на наблюдение: тежки увреждания (като напр. язва на роговицата, простираща се извън повърхностните слоеве на стромата), унищожаване на канта > 50 % (видно от избледняването на конюнктивната тъкан) и тежка инфекция на окото (гнойна секреция). Комбинация от: васкуларизация на повърхността на роговицата (т.е. панус); област на флуоресцеиново оцветяване, която не намалява с течение на времето, въз основа на ежедневна оценка; и/или липса на липса на повторна епителизация 5 дни след прилагането на изпитвания химикал може също да бъде счестена за потенциално полезен критерий за оказване на влияние върху клиничното решение за предсрочно прекратяване на проучването. Взети поотделно обаче тези констатации са недостатъчни за обосноваване на предсрочното прекратяване на проучването. След установяването на тежки ефекти върху очите следва да бъде консултиран лекуващ или квалифициран за лабораторни животни ветеринарен лекар, или персонал, обучен за установяване на клинични увреждания, за клиничен преглед с оглед определяне определи дали комбинацията от тези ефекти обосновава преждевременното прекратяване на проучването. Степента на очните реакции (конюнктивна, роговица и ирис) следва да се определя и записва 1, 24, 48 и 72 часа след прилагането на изпитвания химикал (таблица 1). Опитните животни, при които не се развиват очни увреждания, могат да бъдат умъртвени не по-рано от 3 дни след накапването. Опитните животни с увреждания, които не са тежки, следва да се наблюдават до отшумяване на увреждането или в продължение на 21 дни, след което изпитването се прекратява. Като минимум наблюденията следва да се извършват и записват след 1 час, 24 часа, 48 часа, 72 часа, 7 дни, 14 дни и 21 дни, за да се прецени състоянието на уврежданията и тяхната обратимост или необратимост. Ако е необходимо, следва да се извършват по-чести наблюдения, за да се определи дали изпитваното животно следва да бъде умъртвено по хуманни съображения или изключено от изследването поради отрицателни резултати.

Степените на очните увреждания (таблица 1) трябва да бъдат записвани при всеки преглед. Всички други очни увреждания (например панус, оцветяване, изменения в предната камера) или неблагоприятни общи ефекти също следва да се протоколират.

Прегледът на реакциите може да се улесни чрез използване на бинокулярна лупа, ръчна шпалт-лампа, биомикроскоп или друг подходящ уред. След отчитане на наблюденията на 24-ия час очите могат допълнително да се изследват с помощта на флуоресцеин.

Степенуването на очните реакции непременно е субективно. За да се постигне съответствие в степенуването на очните реакции и да се подпомогнат изпитващите лаборатории, както и тези, в които се провеждат интерпретират наблюденията, персоналът, извършващ наблюдението, следва да бъде достатъчно обучен да прилага класификационната скала.

▼ **M7****ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ****Оценка на резултатите**

Баловата оценка на очното дразнене следва да се разглежда заедно с естеството, тежестта и обратимостта или необратимостта на настъпилите увреждания. Индивидуалната балова оценка не е абсолютен стандарт за определяне на дразнещите свойства на даден химикал, тъй като се оценяват и други ефекти на изпитвания химикал. Вместо това индивидуалният бал следва да се разглежда като референтна стойност, която има съдържание само когато е подкрепена от пълното описание и оценка на всички наблюдения.

Протокол от изпитването

Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Обосновка на изпитването in vivo: основан на тежестта на доказателствата анализ на съществуващите данни от предишни изпитвания, включително резултатите от прилагането на стратегията за последователно изпитване:

- описание на относимите данни от предходни изпитвания;
- данни, получени при всяка стъпка от стратегията за изпитване;
- описание на извършените изпитвания *in vitro*, включително подробно представяне на процедурите за изпитване и резултатите, получени за изпитваните/референтните химикали;
- описание на проведеното изследване *in vivo* за дразнещо/корозивно действие върху кожата, включително получените резултати;
- основан на тежестта на доказателствата анализ с оглед извършване на *in vivo* проучване.

Изпитван химикал:

- данни за идентификация (напр. химично наименование и, при наличност, CAS номер, чистота, известни онечиствания, източник, номер на партидата);
- физична природа и физични и химични свойства (например рН, летливост, разтворимост, стабилност, реакция с вода);
- в случай на смес следва да бъдат идентифицирани компонентите, включително идентификационни данни на веществата компоненти (напр. химично наименование и CAS номера, ако има такива), както и техните концентрации;
- приложена доза.

Носител:

- химично идентифициране, концентрация (когато е необходимо), използван обем;
- обосноваване на избора на носител.

Изпитвани животни:

- използван вид/порода, обосновка за използване на животни, различни от зайци албиноси;
- възраст на всяко животно в началото на изследването;
- брой на животните от всеки пол в изпитваните и контролните групи (когато се изисква);
- индивидуална телесна маса на всяко животно в началото и в края на изпитването;
- източник за доставка на животните, условия на отглеждане, диета и т.н.

▼ **M7***Анестетици и аналгетици*

- дози и време на прилагане на местни анестетици и общи аналгетици;
- когато се използва местен анестетик, за него се представят данни за идентификация, чистота, тип и потенциал за взаимодействие с изпитвания химикал.

Резултати:

- описание на метода, използван за степенуване с балови оценки на дразненето във всеки момент на наблюдение (напр. използване на ръчна шпалт-лампа, биомикроскоп, флуоресцеин);
- представяне в табличен вид на данните за отклика при дразнещо/корозивно действие за всяко животно във всички моменти на наблюдение до отстраняването на всяко животно от изпитването;
- текстово описание на степента и естеството на наблюдаваните прояви на дразнещо/корозивно действие;
- описание на всички други очни увреждания (например васкуларизация, образуване на панус, адхезии, оцветяване);
- описание на местните и общите неблагоприятни ефекти, различни от очни увреждания, протоколиране на клиничните признаци на болка и дистрес, цифрови снимки и хистопатологични наблюдения, ако такива са налице.

*Обсъждане на резултатите***Тълкуване на резултатите**

Екстраполацията на резултатите от проучванията на очното дразнене върху лабораторни животни към хора е валидна само в ограничена степен. В много случаи зайците албиноси са по-чувствителни от хората към вещества с дразнещо или корозивно действие върху очите.

При тълкуването на данните следва внимателно да се изключи възможността дразненето да е предизвикано вследствие на вторична инфекция.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Barratt, M.D., *et al.* (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410 — 429.
- (2) de Silva, O., *et al.* (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol. 35, 159 — 164.
- (3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.
- (4) Young, J.R., *et al.* (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 — 26.
- (5) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 — 231.
- (6) Fentem, J.H., *et al.* (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, Toxicology *in vitro* 12, pp.483 — 524.
- (7) Глава Б.4 от настоящото приложение, *Остра токсичност: кожно дразнещо/корозивно действие*.

▼ M7

- (8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, May/June, 20-36.
- (10) National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.
- (11) National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.
- (12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.
- <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest-TMER.htm>
- (13) Глава Б.40 от настоящото приложение, *In vitro* кожна корозия: транскутанно измерване на електрическото съпротивление на кожата (TER).
- (14) Глава Б.40А от настоящото приложение, *In vitro* кожна корозия: изпитване върху модел на човешка кожа.
- (15) OECD (2006), Test No. 435: *In vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.
- (16) Глава Б.47 от настоящото приложение, Метод за изпитване на непрозрачност и пропускливост на говеждата роговица за идентификация на i) химикали, причиняващи сериозно увреждане на очите и ii) химикали, не изискващи класифициране за дразнещо действие върху очите или сериозно увреждане на очите.
- (17) Глава Б.48 от настоящото приложение, Метод за изпитване с изолирани птичи очи за определяне на i) химикали, причиняващи сериозно увреждане на очите и ii) химикали, не изискващи класифициране за дразнещо действие върху очите или сериозно увреждане на очите.
- (18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3rd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.
- (19) UN (2011), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications.
- (20) EC (2008), Regulation (EC) No. 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No. 1907/2006. Official Journal of the European Union L353, 1-1355.
- (21) ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼ M7

Таблица 1

Скала на очните увреждания

Роговица	Степен
Непрозрачност: степен на плътност (стойностите следва да се отчитат от най-плътния участък) (*)	
Отсъствие на язва или непрозрачност	0
Разпръснати или дифузни зони на непрозрачност (различни от леко замъгляване на нормалния блясък); детайлите от ириса са ясно видими	1
Лесно забележима полупрозрачна област; детайлите от ириса са леко замъглени	2
Зона със седефен цвят; детайлите от ириса не се забелязват; едва различима големина на зеницата	3
Непрозрачна роговица; ирисът не се различава през непрозрачната роговица	4
Максимален бал: 4	
Ирис	
Нормално	0
Забележимо увеличени гънки, конгестия, оток, умерена перикорнеална хиперемия; или инжектиране; ирисът реагира на светлина (бавната реакция се смята за ефект	1
Кръвоизлив, видимо макроскопски разрушаване на нормалната структура, или липса на реакция на светлина	2
Максимален бал: 2	
Конюнктиви	
Еритем (отнася се за палпебралната и булбарната конюнктива; с изключение на роговицата и ириса)	
Нормално	0
Хиперемия на някои кръвоносни съдове (след инжектиране)	1
Дифузно кървавочервено оцветяване; отделните кръвоносни съдове са трудно различими	2
Дифузно оцветяване, цвят на говеждо месо	3
Максимален бал: 3	
Хемоза	
Оток (отнася се за клепачите и/или мигателните ципи)	
Нормално	0
Наличие на оток над нормалното състояние	1
Ясно изразен оток с частично обръщане на клепачите	2
Оток със затворени приблизително наполовина клепачи	3
Оток със затворени повече от наполовина клепачи	4
Максимален бал: 4	

(*) Зоната на непрозрачност на роговицата следва да бъде отбелязана.

▼ **M7***Допълнение***ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

Киселинен/алкален резерв: За киселинните препарати това е количеството (g) натриев хидроксид за 100 g от препарата, необходимо за получаване на определена стойност на рН. За алкалните препарати това е количеството (g) натриев хидроксид, еквивалентно на количеството (g) сярна киселина за 100 g от препарата, необходимо за получаване на определена стойност на рН (Young *et al.* 1988).

Химикал: Вещество или смес.

Вещества, които не са с дразнещо действие: Вещества, които не се класифицират като вещества с дразнещо действие върху очите от категория I, II, или III по ЕРА; или вещества с дразнещо действие върху очите от категория 1, 2, 2А или 2В на Глобалната хармонизирана система за класифициране и етикетирание на химикали (GHS); или от категория 1 или 2 на ЕС (17) (18) (19).

Химикал с корозивно действие върху очите: а) химикал, който причинява необратимо тъканно увреждане на окото; б) химикали, които се класифицират като такива с дразнещо действие върху очите от категория 1 на GHS, с дразнещо действие върху очите от категория I по ЕРА, или от категория 1 на ЕС (17) (18) (19).

Химикал с дразнещо действие върху очите: а) химикал, който причинява обратимо изменение в окото; б) химикали, които са класифицирани като химикали с дразнещо действие върху очите от категория II или III по ЕРА; или химикали с дразнещо действие върху очите от категория 2, 2А или 2В на Глобалната хармонизирана система за класифициране и етикетирание на химикали (GHS); или от категория 2 на ЕС (17) (18) (19).

Химикал със силно дразнещо действие върху очите: а) химикал, който причинява тъканно увреждане на окото, което не преминава до 21 дни след прилагането или причинява сериозно физическо влошаване на зрението; б) химикали, които се класифицират като такива с дразнещо действие върху очите от категория 1 на GHS, или с дразнещо действие върху очите от категория I по ЕРА, или от категория 1 на ЕС (17) (18) (19).

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

Поетапен подход: Стратегия за поетапно изпитване, при която цялата съществуваща информация за даден изпитван химикал се разглежда по конкретен ред, като на всеки етап се прилага процес, основан на тежестта на доказателствата, за определяне дали съществува достатъчно информация за вземане на решение за класифициране с оглед на опасността, преди да се премине към следващия етап. Ако потенциалът за дразнещо действие на даден изпитван химикал може да се определи въз основа на съществуващата информация, не се налага допълнително изпитване. Ако потенциалът за дразнещо действие на даден изпитван химикал не може да се определи въз основа на съществуващата информация, се провежда процедура за поетапно последователно изпитване върху животни, докато стане възможно да се направи ясно класифициране.

Процес, основан на тежестта на доказателствата: Силните и слабите страни на дадено събиране на информация се използват като основа за заключение, което може да не е очевидно от индивидуалните данни.

▼ **M7****ДОПЪЛНЕНИЕ КЪМ МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ Б.5 ⁽¹⁾****СТРАТЕГИЯ ЗА ПОСЛЕДОВАТЕЛНО ИЗПИТВАНЕ ЗА ОЦЕНКА НА ДРАЗНЕЩО/КОРОЗИВНО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ ОЧИТЕ****Общи съображения**

В интерес на научната стойност на проучването и на благополучието на животните е важно да се избягва ненужното използване на опитни животни и да се допускат колкото е възможно по-малко изпитвания, за които се очаква, че ще предизвикат тежки увреждания при животни. Преди разглеждането на изпитване *in vivo* следва да се оцени цялата информация, относима към потенциала за дразнещо/корозивно действие на даден химикал върху очите. Възможно е вече да съществуват достатъчни доказателства, въз основа на които химикалът може да се класифицира по отношение на потенциала си за дразнещо/корозивно действие върху очите, без да е необходимо да се извършват изпитвания върху лабораторни животни. Затова чрез основан на тежестта на доказателствата анализ и стратегия за последователно изпитване ще се сведе до минимум необходимостта от изпитвания *in vivo*, особено когато се очаква химикалът да предизвика тежки увреждания.

Препоръчва се да се извърши основан на тежестта на доказателствата анализ за оценка на съществуващата информация за дразнещо/корозивно действие на химикалите върху очите и за определяне дали да се проведат други проучвания, различни от изпитвания *in vivo* върху очите, които могат да подпомогнат характеризирането на такъв потенциал. Когато са нужни по-нататъшни проучвания, се препоръчва относимите експериментални данни да се получат, като се приложи стратегията за последователно изпитване. За веществата, които не са изпитвани досега, следва да се използва стратегията за последователно изпитване, за да се съберат данните, необходими за оценката на тяхното корозивно/дразнещо действие върху очите. Първоначалната стратегия за изпитване, описана в настоящото допълнение, е разработена на семинар на ОИСП (1). По-късно тя е утвърдена и разширена в рамките на Хармонизираната интегрирана система за класифициране на опасностите във връзка с въздействията на химичните вещества върху човешкото здраве и околната среда, приета на 28-ата съвместна среща на Комитета по химикалите и работната група по химикалите през ноември 1998 г. (2), и актуализирана от експертна група на ОИСП през 2011 г.

Въпреки че посочената стратегия за последователно изпитване не е включена като неразделна част от метод В.5, тя представлява препоръчителният подход за определяне на свойствата, свързани с дразнещо/корозивно действие върху очите. Този подход представлява както най-добра практика, така и стандарт за етика при изпитванията *in vivo* за оценка на дразнещото/корозивното действие върху очите. В метода за изпитване са дадени указания за провеждането на изпитването *in vivo* и се обобщават факторите, които следва да се вземат предвид преди разглеждането на такова изпитване. Стратегията за последователно изпитване предлага основан на тежестта на доказателствата подход за оценка на съществуващите данни за дразнещото/корозивното действие върху очите на химикалите и поетапен подход за получаване на относими данни за химикалите, за които са необходими допълнителни изследвания или за които досега не са извършвани изследвания. В стратегията се включва извършване първоначално на валидиращи и приети изпитвания *in vitro* или *ex vivo*, а след това на изследвания по МИ Б.4 при определени условия (3) (4).

Описание на стратегията за поетапно изпитване

Преди да се предприемат изпитвания в рамките на стратегията за последователно изпитване (вж. фигурата), следва да се оцени цялата налична информация с оглед определяне на необходимостта от провеждане на изпитване *in vivo* върху очите. Въпреки че значима информация може да се получи и при оценката на отделни параметри (например екстремални стойности на рН), следва съществуващата информация да бъде оценена в

⁽¹⁾ За използване на интегрирана стратегия за изпитване за дразнещо действие върху очите в рамките на REACH, вж. също ЕСНА, „Ръководство относно изискванията за информация и оценката на безопасността на химичните вещества“ глава R.7a: Endpoint specific guidance http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼ **M7**

нейната цялост. При вземане на решение, основано на тежестта на доказателствата, следва да бъдат оценени всички относими данни за ефектите на даден химикал и на неговите структурни аналози, и следва да се представи обосновка за взетото решение. На първо място следва да се обърне внимание на свързаните с хора и животни съществуващи данни по отношение на химикала, а след това следва да се оценят резултатите от изпитванията *in vitro* или *ex vivo*. Във всички случаи, когато е възможно, следва да се избягва провеждането на *in vivo* изпитвания на корозивни химикали. Факторите, които се вземат под внимание в стратегията за изпитване, включват:

Оценка на съществуващите данни за хора и/или животни и/или *in vitro* данни от валидирани и международно приети методи (стъпка 1).

Съществуващите данни за хора, като например клинични проучвания, проучвания от трудова медицина, протоколирани случаи и/или данни от изпитвания върху животни и/или изследвания на очите, и/или *in vitro* данни от валидирани и международно приети методи за корозивно/дразнещо действие върху очите, следва да се разглеждат с предимство, защото те осигуряват информация, пряко свързана с въздействието върху очите. След това следва да се оценят данните за корозивно/дразнещо действие върху кожата, налични от проучвания върху хора и/или животни, и/или изследвания *in vitro* от валидирани и международно приети методи, свързани с корозия на кожата. Химикалите, за които е известно че са корозивни или силно дразнещи за очите, и химикалите, показващи корозивно или силно дразнещо действие върху кожата, не следва да се накапват в очите на животните; такива химикали следва да се разглеждат като корозивни и/или дразнещи също и за очите. Също така не е необходимо да се провеждат *in vivo* изпитвания на химикали, за които съществуват достатъчно данни от предходни проучвания за отсъствие на дразнещо или корозивно действие върху очите.

Анализ на зависимостта „структура-активност“ (SAR) (стъпка 2).

Резултатите от изпитвания на структурно подобни химикали следва да се вземат под внимание, ако са налични. Когато за структурно подобни вещества или смеси от такива вещества съществуват достатъчно данни за хора и/или животни, показващи потенциала им за корозивно/дразнещо действие върху очите, може да се приеме, че химикалът за изпитване ще предизвика същия отклик. В тези случаи е възможно да не е необходимо изпитване на химикала. Съгласно стратегията за последователно изпитване негативните данни от проучвания на структурно подобни вещества или смеси от такива вещества не се смятат като достатъчно доказателство, за да се приеме отсъствие на корозивен или дразнещ ефект за даден химикал. За установяване на потенциала за корозивно/дразнещо действие върху кожата и очите следва да се използват валидирани и приети SAR подходи.

Физични и химични свойства и реакционна способност на химикала (стъпка 3).

Химикалите, показващи екстремални стойности на рН, като $\leq 2,0$ или $\geq 11,5$ могат да предизвикат силно изразени локални ефекти. Когато даден химикал може да се определи като корозивен или дразнещ за очите въз основа на екстремални стойности на рН, може да се вземе под внимание и неговият киселинен/алкален резерв (буферен капацитет) (5)(6)(7). Когато буферният капацитет позволява да се предположи, че даден химикал може да не е корозивен за очите (т.е. химикали с екстремална стойност на рН и ниска стойност за киселинния/алкалния резерв), следва да се проведе по-нататъшно изпитване за потвърждаване на това предположение, за предпочитане посредством валидирано и прието изпитване *in vitro* или *ex vivo* (вж. точка 10).

Разглеждане на друга налична информация (стъпка 4).

На този етап следва да се оцени цялата налична информация за общата токсичност по дермален път на постъпване. Острата дермална токсичност на изпитвания химикал също следва да се вземе под внимание. Когато е доказано, че даден химикал проявява силна токсичност по дермален път, е възможно да не е необходимо той да бъде изпитван върху очите. Въпреки че не винаги съществува връзка между острата дермална токсичност и

▼ M7

дразнешото/корозивното действие върху очите, може да се допусне, че даден агент, който е силно токсичен по дермален път, ще прояви силна токсичност и при накапване в очите. Такива данни могат да се разгледат също и между стъпки 2 и 3.

Оценка на корозивното действие на химикала върху кожата, ако тя също е необходима за регулаторни цели (стъпка 5).

Най-напред следва да се оцени потенциалът за корозивно и силно дразнещо действие върху кожата, в съответствие с метод за изпитване Б.4 (4) и придружаващото го допълнение (8), включително използването на валидирани и международно приети *in vitro* методи за изпитване за корозия на кожата (9) (10) (11). Ако е доказано, че химикалът предизвиква корозия или силно дразнене на кожата, може също да се смята, че той има и корозивно или силно дразнещо действие върху очите. По този начин не се изискват допълнителни изпитвания. Ако химикалът не предизвиква корозия или силно дразнене на кожата, следва да се извърши изпитване *in vitro* или *ex vivo* за действие върху очите.

Резултати от изпитвания *in vitro* или *ex vivo* (стъпка 6).

За химикалите, за които е доказано корозивно или силно дразнещо действие при изпитване *in vitro* или *ex vivo*, валидирано и международно прието конкретно за оценка на корозивно/дразнещо действие върху очите (12)(13), не е необходимо изпитване върху животни. Може да се приеме, че тези химикали ще предизвикат подобни силно изразени ефекти *in vivo*. Когато не съществуват валидирани и приети изпитвания *in vitro/ex vivo*, следва да се пропусне стъпка 6 и да се премине направо към стъпка 7.

Изпитване *in vivo* върху зайци (стъпки 7 и 8).

Изпитването *in vivo* за действие върху очите следва да започне с първоначално изпитване върху едно животно. Когато резултатите от това изпитване показват, че химикалът проявява силно дразнещо или корозивно действие върху очите, не следва да се извършва по-нататъшно изпитване. Ако при посоченото изпитване не бъде наблюдаван никакъв корозивен или силно дразнещ ефект, се извършва потвърждаващо изпитване с две допълнителни животни. В зависимост от резултатите от потвърждаващо изпитване може да са необходими допълнителни изпитвания. [виж метод за изпитване Б.5]

▼ M7

СТРАТЕГИЯ ЗА ИЗПИТВАНЕ И ОЦЕНКА НА ДРАЗНЕЩО/КОРОЗИВНО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ ОЧИТЕ

	Дейност	Констатация	Заклучение
1	<p>Съществуващи данни за хора и/или животни и/или <i>in vitro</i> данни от валидирани и международно приети методи, показващи действие върху очите</p> <p>Съществуващи данни за хора и/или животни и/или <i>in vitro</i> данни от валидирани и международно приети методи, показващи корозивно действие върху кожата</p> <p>Съществуващи данни за хора и/или животни и/или <i>in vitro</i> данни от валидирани и международно приети методи, показващи силно дразнещо действие върху кожата</p>	<p>Тежко увреждане на очите</p> <p>С дразнещо действие върху очите</p> <p>Действието върху очите не е корозивно/не е дразнещо</p> <p>Корозивно действие върху кожата</p> <p>Силно дразнещо действие върху кожата</p>	<p>Апикална крайна точка; смята се, че е с корозивно действие върху очите. Не е необходимо да се изпитва.</p> <p>Апикална крайна точка; смята се, че е с дразнещо действие върху очите. Не е необходимо да се изпитва.</p> <p>Апикална крайна точка; смята се, че не е с корозивно или дразнещо действие върху очите. Не е необходимо да се изпитва.</p> <p>Допуска се, че е с корозивно действие върху очите. Не е необходимо да се изпитва.</p> <p>Допуска се, че е с дразнещо действие върху очите. Не е необходимо да се изпитва</p>
	↓		
	<i>липсва информация или от наличната информация не може да се направи заключение</i>		
	↓		
2	<p>Извършва се SAR за корозивно/дразнещо действие върху очите</p> <p>Разглежда се SAR за корозия на кожата.</p>	<p>Прогнозира се тежко увреждане на очите.</p> <p>Прогнозира се дразнещо действие върху очите.</p> <p>Прогнозира се корозия на кожата.</p>	<p>Допуска се, че е с корозивно действие върху очите. Не е необходимо да се изпитва.</p> <p>Допуска се, че е с дразнещо действие върху очите. Не е необходимо да се изпитва.</p> <p>Допуска се, че е с корозивно действие върху очите. Не е необходимо да се изпитва.</p>
	↓		
	<i>Не могат да бъдат направени прогнози, или въз основа на прогнозите не може да се направи заключение, или прогнозите са негативни</i>		
	↓		
3	Измерете pH (буферния капацитет, когато е относимо).	pH ≤ 2 или ≥ 11,5 (с висок буферен капацитет, когато е относимо)	Допуска се, че е с корозивно действие върху очите. Не е необходимо да се изпитва.
	↓		
	<i>2 < pH < 11,5, или pH ≤ 2,0 или ≥ 11,5 с нисък буферен капацитет или без буферен капацитет, когато е относимо</i>		
	↓		
4	Разглеждат се наличните данни за общата токсичност по дермален път	Силно токсичен при концентрации, които могат да бъдат изпитвани върху очите.	Химикалт е прекомерно токсичен и не може да се проведе изпитване. Не е необходимо да се изпитва.

▼ M7

	Дейност	Констатация	Заклучение
	↓		
	<i>Липсва такава информация или химикалът не е силно токсичен</i>		
	↓		
5	Оценява се опитно потенциалът за корозия на кожата, съгласно стратегията за изпитване в глава Б.4 от настоящото приложение, когато това се изисква и за регулаторни цели	Реакция за корозивно или силно дразнещо действие	Допуска се, че е с корозивно действие върху очите. Не е необходимо по-нататъшно изпитване.
	↓		
	<i>Химикалът не проявява корозивно или силно дразнещо действие върху кожата.</i>		
	↓		
6	Провежда се валидирано и утвърдено изпитване (или изпитвания) <i>in vitro</i> или <i>ex vivo</i> върху очите	<p>Реакция за корозивно или силно дразнещо действие</p> <p>Реакция за дразнещо действие</p> <p>Реакция за липса на дразнещо действие</p>	<p>Допуска се, че е с корозивно или силно дразнещо действие върху очите, при условие че извършеното изпитване може да се използва за определяне на химикали с корозивно/силно дразнещо действие, и при условие че химикалът е в рамките на областта на приложимост на изпитването. Не е необходимо по-нататъшно изпитване.</p> <p>Допуска се, че е с дразнещо действие върху очите, при условие че извършеното изпитване (или изпитвания) може да се използва за правилно определяне на химикали с корозивно, силно дразнещо и дразнещо действие, и при условие че химикалът е в рамките на областта на приложимост на изпитването (или изпитванията). Не е необходимо по-нататъшно изпитване.</p> <p>Допуска се, че не е с дразнещо действие върху очите, при условие че извършеното изпитване (или изпитвания) може да се използва за правилно определяне на химикали, които не са с дразнещо действие, за правилното им разграничаване от химикали, които са с дразнещо, силно дразнещо или корозивно действие върху очите, и при условие че химикалът е в рамките на областта на приложимост на изпитването. Не е необходимо по-нататъшно изпитване.</p>
	↓		
	<i>Не може да се използва валидирано и прието изпитване (или изпитвания) <i>in vitro</i> или <i>ex vivo</i> върху очите, за да се стигне до заключение</i>		
	↓		

▼ M7

	Дейност	Констатация	Заклучение
7	Извършва се първоначално изпитване <i>in vivo</i> върху очите върху един заек.	Тежко увреждане на очите	Смята се, че е с корозивно действие върху очите. Не е необходимо по-нататъшно изпитване.
	↓		
	<i>Липсва тежко увреждане или не се наблюдава реакция.</i>		
	↓		
8	Извършва се потвърждаващо изпитване върху едно или две допълнителни животни.	Корозивно или дразнещо действие Липсва корозивно или дразнещо действие	Смята се, че е с корозивно или дразнещо действие върху очите. Не е необходимо по-нататъшно изпитване. Смята се, че не е с дразнещо или корозивно действие върху очите. Не е необходимо по-нататъшно изпитване.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 — 24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. *ATLA* 27, 161-177.
- (4) Глава Б.4 от настоящото приложение, Остра токсичност: кожно дразнещо/корозивно действие.
- (5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19 — 26.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzthutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in vitro* 12, pp.483 — 524.
- (7) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.* 12, 227 — 231.
- (8) Допълнение към Глава Б.4 от настоящото приложение, Стратегия за последователно изпитване за дразнения и корозивно действие върху кожата.
- (9) Глава Б.40 от настоящото приложение, In Vitro кожна корозия: транскутанно измерване на електрическото съпротивление на кожата (TER).
- (10) Глава Б.40А от настоящото приложение, In Vitro кожна корозия: изпитване върху модел на човешка кожа.
- (11) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

▼ M7

- (12) Глава Б.47 от настоящото приложение, Метод за изпитване на непрозрачност и пропускливост на говеждата роговица за идентификация на вещества с корозивно и дразнещо действие върху очите.
- (13) Глава Б.48 от настоящото приложение, Метод за изпитване с изолирани птичи очи за определяне на вещества с корозивно и силно дразнещо действие върху очите.



Б.6. КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ

1. МЕТОД

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Забележки:

Чувствителността и възможността на тестовете да определят потенциалните за човека кожни сенсibiliзиращи агенти се считат за важни качества в системата за класификация на токсичността, отнасяща се до общественото здраве.

Не съществува един-единствен тест-метод, който адекватно да идентифицира всички вещества, способни да сенсibiliзират кожата на човек, и който да е подходящ за всички.

При избора на тест следва да се имат предвид фактори като физични характеристики на веществото, включително способността му да премине през кожата.

Разработени са два вида тестове, използващи морски свинчета: тестовете с адювант, в които състоянието на алергия се потенциира от разтваряне или суспендиране на проучваното вещество в цялостния адювант на Freund's (FCA), и тестове без адювант.

Тестовете с адювант изглеждат по-точни при предсказване на възможните кожни сенсibiliзиращи ефекти на дадено вещество у човека, отколкото методите, използващи адюванта на Freund's, и затова са предпочитаните методи.

Максимизиращият тест с морски свинчета (GPMT) е широко употребяван тест с адювант. Въпреки че се използват и някои други методи за откриване потенциала на веществото да предизвика реакция на кожна сенсibiliзация, GPMT се смята за предпочитаната адювантна техника.

Неадювантните тестове, притежавщи много химични класове (предпочитаният е тестът на Buehler) се смятат за по-малко чувствителни.

В определени случаи може да има достатъчно причини за избор на теста на Buehler, който включва по-скоро локално приложение, отколкото интрадермални инжекции, използвани в максимизиращия тест с морски свинчета (GPMT). При използване на теста на Buehler следва да се даде научно обяснение.

Максимизиращият тест с морски свинчета (GPMT) и тестът на Buehler са описани в настоящия метод. Може да се използват и други методи, само ако са добре потвърдени и научно обосновани.

Ако се получи положителен резултат в стандартен скриниращ тест, проучваното вещество може да бъде обявено за потенциален сенсibiliзиращ агент и няма да бъде необходимо продължаване на теста с морски свинчета. Ако резултатът в този тест е отрицателен, то тестът с морски свинчета следва да се продължи според процедурата, описана в настоящия метод.

Вж. също Общо въведение, част Б

▼B

1.2. ДЕФИНИЦИИ

Кожна сенсibilизация: (алергичен контактен дерматит) имунологично медирана кожна реакция към вещество. При човека отговорите се характеризират със сърбеж, еритем, оток, папули, везикули, були или комбинация от всички тях. При други видове реакции може да са различни и да се наблюдава само еритем и оток.

Индукционна експозиция: експериментално излагане на субекта на действието на проучваното вещество с намерението да се индуцира състояние на хиперсензитивност.

Период на индукция: период с продължителност най-малко една седмица, последвал индукционната експозиция, през който може да се развие състояние на хиперсензитивност.

Провокационна експозиция: експериментално излагане на предварително третиран с проучваното вещество субект, след периода на индукция, с цел определяне дали субектът реагира по типа на хиперсензитивност.

1.3. РЕФЕРЕНТНИ ВЕЩЕСТВА

Чувствителността и достоверността на използваните експериментални техники следва да бъдат проверявани на всеки шест месеца с помощта на вещества, за които се знае, че притежават слаби до умерени свойства да предизвикват кожна сенсibilизация.

В добре проведения тест за слаби/умерено силни сенсibilизиращи агенти следва да се очаква отговор от поне 30 % в теста с адювант и поне 15 % в неадювантния тест.

Предпочитат се следните вещества:

CAS номера	EINECS номера	EINECS имена	Общоприети имена
101-86-0	202-983-3	2-хексил-3-фенилпроп-2-енал (хексилнамаaldeхид)	2-хексил-3-фенилпроп-2-енал (хексилнамаaldeхид)
149-30-4	205-736-8	бензотиазол-2-тиол (меркапто-бензотиазол)	каптакс
94-09-7	202-303-5	бензокаин	нордкаин

Съществуват обстоятелства, при които могат да се използват и други контролни вещества, стига те да отговарят на горните критерии и за тях да е дадено съответно обяснение.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

В началото опитните животни се излагат на действието на проучваното вещество посредством вътрекожни инжекции и/или епидермално прилагане (индукционна експозиция). След период на почивка от 10 до 14 дни (период на индукция), по време на който може да се развие имунен отговор, животните се подлагат на провокационна доза. Сравнява се обхватът и степента на кожна реакция към провокационното излагане при опитните животни с тази, показана от контролите, които претърпяват същото третиране по време на индукция и са подложени на провокация.

1.5. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДИТЕ НА ИЗПИТВАНЕ

Ако се наложи отстраняване на проучваното вещество, това следва да се извърши с вода или друг подходящ разтворител, без да се промени съществуващият (наличният) отговор или целостта на епидермиса.

▼ B

- 1.5.1. *Максимизиращ тест с морски свинчета (GPMТ)*
- 1.5.1.1. Подготовка
- Здрави млади, полово зрели морски свинчета албиноси се аклиматизират в продължение на поне 5 дни преди теста към лабораторните условия. Преди теста животните се подбират случайно и се разпределят в групите за третиране. Отстраняването на козината става чрез подстригване, бръснене или при възможност химическа депилация, в зависимост от използвания тест-метод. Следва да се внимава да не се увреди кожата. Животните се претеглят преди началото на теста и в неговия край.
- 1.5.1.2. Условия за провеждане на теста
- 1.5.1.2.1. Опитни животни
- Обикновено се използват лабораторни породи от морски свинчета албиноси.
- 1.5.1.2.2. Брой и пол
- Могат да се използват мъжки и/или женски животни. Ако се използват женски, те следва да нямат партньор и да не са бременни.
- Използват се минимум по 10 животни в третираните групи и поне 5 в контролната група. Ако се използват по-малко от 20 опитни и 10 контролни морски свинчета и не е възможно да се направи изводът, че проучваното вещество е сенсibiliзиращ агент, силно се препоръчва тестване на допълнителен брой животни, така че общият брой да бъде поне 20 опитни и 10 контролни животни.
- 1.5.1.2.3. Дозови нива
- Концентрацията на проучваното вещество, използвано за индукционна експозиция, следва да бъде системно добре толерирано и би следвало да представлява най-високата концентрация, която предизвиква леко до умерено кожно дразнене. Концентрацията, използвана за провокационно излагане, следва да бъде най-високата не предизвикваща дразнене доза. При необходимост подходящата концентрация може да се определи чрез пилотно проучване, използващо две или три животни. За тази цел следва да се отдаде внимание (предпочитание) на използването на животни, третирани с FCA.
- 1.5.1.3. Процедура
- 1.5.1.3.1. Индукция
- Ден 0 за третираната група
- Поставят се три двойки вътрекожни инжекции с обем 0,1 ml в областта на рамото, което следва да се почисти от козина, така че всяко едно убождане от двойката да лежи от всяка страна на срединната линия.
- Инжекция 1: в отношение 1:1 смес (об/об) FCA/вода или физиологичен разтвор.
- Инжекция 2: проучваното вещество в избраната концентрация, поставено в подходяща среда.
- Инжекция 3: проучваното вещество в избраната концентрация, поставено в съотношение 1:1 смес (об/об) FCA/вода или физиологичен разтвор.
- В инжекция 3 водноразтворимите вещества се разтварят във водната фаза преди смесването им с FCA. Масноразтворимите или неразтворимите вещества се суспендират в FCA преди смесването им с водната фаза. Крайната концентрация на проучваното вещество следва да бъде еднаква с използваната в инжекция 2.

▼B

Инжекции 1 и 2 се поставят близо една до друга, възможно най-близо до главата, докато № 3 се поставя към най-долната (каудалната) част на опитната област.

Ден 0 на контролната група

Поставят се три двойки вътрекожни инжекции с обем 0,1 ml в същите области както на третираните животни.

Инжекция 1: в отношение 1:1 смес (об/об) FCA/вода или физиологичен разтвор.

Инжекция 2: неразредена среда.

Инжекция 3: съотношение 50 % т/об от средата в отношение 1:1 смес (об/об) FCA/вода или физиологичен серум.

Ден 5—7 на третираната и контролната група

Около двадесет и четири часа преди локално (местно) приложената индукция, ако веществото не е кожен дразнител, мястото за опит, след добро подстригване и/или бръснене, се третира с 0,5 ml 10 % натриев лаурил сулфат във вазелин с цел създаване на местно дразнене.

Ден 6—8 на третираната група

Мястото за опита отново се почиства от козина. Филтърна хартия (2 × 4 см), добре натоварена с проучваното вещество в подходяща среда, се поставя на опитното място и се оставя в тесен контакт чрез оклузивна превръзка в продължение на 48 часа. Изборът на средата следва да се обоснове. Твърдите вещества се пулверизират и инкорпорират в подходяща среда. Ако е необходимо, течните вещества могат да се прилагат неразредени.

Ден 6—8 на контролната група

Мястото за опит се почиства отново от козината. Средата се поставя самостоятелно по подобен начин на опитното място и се поддържа в контакт с помощта на оклузивна превръзка в продължение на 48 часа.

1.5.1.3.2. Провокация

Ден 20—22 на третираната и контролната група

Хълбоците на третираните и контролните животни се почиства от козина. Част от пластир или цяла превръзка, натоварена с проучваното вещество, се прилага на единия хълбок на опитното животно и при необходимост част от пластир, натоварен само със средата, може да се постави на другия хълбок. Пластирите се поддържат в контакт чрез оклузивни превръзки в продължение на 24 часа.

1.5.1.3.3. Наблюдение и степенуване: третирана и контролна група

— около 21 часа след премахване на пластира мястото за провокация се почиства и се подстригва и/или бръсне добре и при необходимост се депилира;

— около 3 часа по-късно (приблизително 48 часа след началото на провокационното прилагане) се наблюдава кожната реактивност и данните се записват според степените, показани в допълнението;

— около 24 часа след това наблюдение се извършва второ (72 часа) и отново данните се записват.

Препоръчва се сляпото наблюдение на опитните и контролните животни.

Ако е необходимо да се изяснят резултатите, получени по време на първата провокация, следва да се обсъди втора провокация (т.е. репровокация), около една седмица след първата, при възможност с нова контролна група. Повторната провокация може да се извърши и с първата контролна група.

▼ B

Всички кожни реакции, както и всяко необичайно явление, включително системни реакции, резултат на индукционни или провокационни процедури, следва да се наблюдават и записват според скалата за степени на Magnusson/Kligman (вж. допълнението). За да се уточнят съмнителните резултати, може да се проведат и други процедури, като напр. хистопатологично изследване, измерване на дебелината на кожната гънка.

1.5.2. *Тест на Buehler*

1.5.2.1. Подготовка

Здрави млади, полово зрели морски свинчета албиноси се аклиматизират в продължение на поне 5 дни преди теста към лабораторните условия. Преди теста животните се подбират случайно и се разпределят в групите за третиране. Отстраняването на козината става чрез подстригване, бръснене или при възможност чрез химическа депилация, в зависимост от използвания тест-метод. Следва да се внимава да не се увреди кожата. Животните се претеглят преди началото на теста и в неговия край.

1.5.2.2. Условия за провеждане на теста

1.5.2.2.1. Опитни животни

Обикновено се използват лабораторни породи от морски свинчета албиноси.

1.5.2.2.2. Брой и пол

Могат да се използват мъжки и/или женски животни. Ако се използват женски, те следва да нямат партньор и да не са бременни.

Използват се минимум 20 животни в третираната група и поне 10 в контролната.

1.5.2.2.3. Дозови нива

Концентрацията на проучваното вещество, използвано за индукционна експозиция, следва да бъде възможно най-високата концентрация, която предизвиква умерено, но не значително кожно дразнене. Концентрацията, използвана за провокационно излагане, следва да бъде най-високата непредизвикваща дразнене доза. При необходимост подходящата концентрация може да се определи чрез пилотно проучване, използващо две или три животни.

За водноразтворимите проучвани вещества е подходящо да се използва вода или недразнещ разтвор на сърфактант като среда. За другите проучвани вещества се предпочита 80 % етанол/вода за индукцията и ацетон за провокацията.

1.5.2.3. Процедура

1.5.2.3.1. Индукция

Ден 0 на третираната група

Единият хълбок се почиства от козина (ниско подстриган). Пластирът, предназначен за теста, следва да бъде добре натоварен с проучваното вещество в подходяща среда (изборът на средата следва да се обоснове; при необходимост течните вещества могат да се прилагат неразредени).

Пластирът за опита се поставя на опитното място и се оставя в тесен контакт с кожата чрез оклузивна превръзка в продължение на 6 часа.

▼B

Системата с пластири за опита следва да бъде оклузивна. Подходящо е използването на памучен тампон — кръгъл или правоъгълен по форма, с площ около 4—6 cm². Предпочита се използването на специални задържащи превръзки, с които да се постигне максимална оклузия. Ако се използва бинтоване, е възможно да се наложи допълнително излагане на действието на веществото.

Ден 0 на контролната група

Единият хълбок се почиства от козина (ниско подстриган). Прилага се само средата по начин, подобен на описания за третираната група. Пластирът за опита се поставя на опитното място и се оставя в тесен контакт с кожата чрез оклузивна превръзка в продължение на 6 часа. Ако се покаже, че не е необходимо включването на фалшива контролна група, може да се използва началната.

Ден 6—8 и 13—15 на третираната и контролната група

Извършва се същият начин на прилагане както в ден 0, на същото опитно място (при необходимост почищено от козина), на същия хълбок — на ден 6—8 и отново на ден 13—15.

1.5.2.3.2. Провокация

Ден 27—29 на третираната и контролната група

Нетретираният хълбок на третираните и контролните животни се почиства от косми (ниско подстригване). Поставя се част или целият оклузивен пластир, съдържащ съответното количество проучвано вещество в максимално недразнеща концентрация, върху задната част на нетретирания хълбок на третираните и контролните животни.

Ако е уместно, се поставя също и част или целият оклузивен пластир, натоварен само със средата, върху предната част на нетретирания хълбок, както на третираните, така и на контролните животни. Пластирът се оставя в тесен контакт с кожата чрез подходяща превръзка в продължение на 6 часа.

1.5.2.3.3. Наблюдение и степенуване

— около 21 часа след премахване на пластира мястото за провокация се почиства от козина;

— около 3 часа по-късно (приблизително 30 часа след прилагане на пластира за провокация) се наблюдава кожната реактивност и данните се записват според степените, показани в допълнението;

— около 24 часа след тридесетте часа на наблюдение (около 54 часа след прилагане на пластира за провокация) отново се наблюдава кожната реактивност, отново данните се записват.

Препоръчва се сляпото наблюдение на опитните и контролните животни.

Ако е необходимо да се изяснят резултатите, получени по време на първата провокация, следва да се обсъди втора провокация (т.е. репровокация) около една седмица след първата, при възможност с нова контролна група. Повторната провокация може да се извърши и с първата контролна група.

▼B

Всички кожни реакции, както и всяко необичайно явление, включително системни реакции, резултат на индукционни или провокационни процедури, следва да се наблюдават и записват според степенната скала на Magnusson/Kligman (вж. допълнението). За са се уточнят съмнителните резултати, може да се проведат и други процедури, като напр. хистопатологично изследване, измерване на дебелината на кожната гънка.

2. **ДАНИИ (GPMT И BUEHLER)**

Данните следва да се обобщят в таблична форма, показваща кожните реакции на всяко едно животно при всяко наблюдение.

3. **ДОКЛАДВАНЕ (GPMT И BUEHLER)**

Ако скриниращото изследване се проведе преди теста с морски свинчета, следва да се приложи описанието или позовавания към теста (напр. изследване на регионарните лимфни възли (LLNA), тест за подуване ушите на мишките (MEST), включващи подробности от процедурата, както и получените резултати за проучваното и референтните вещества.

Доклад за теста (GPMT и Buehler test)

Докладът за теста следва да включва, по възможност, следната информация:

Опитни животни:

- използвана порода морски свинчета;
- брой, възраст и пол на животните;
- източник, условия на отглеждане, хранене и т.н.;
- индивидуалното тегло на животните в началото и в края на теста.

Условия за провеждане на теста:

- техника за подготовка на мястото за прилагане на пластира;
- подробно описание на естеството на използваните пластири и техники за прилагането им;
- резултати от пилотно проучване, даващо обосновка на използваните в теста концентрации за индукция и провокация;
- подробно описание на подготовката на проучваното вещество, начина на прилагане и отстраняването му;
- обосновка на избора на среда;
- концентрации на проучваното вещество и средата в стадий на индукция и провокация, както и общото количество вещество, приложено при индукцията и провокацията.

Резултати:

- обобщение на резултатите от последната проверка за чувствителност и достоверност (вж. 1.3), включително информация относно използваните вещество, концентрация и среда;

▼B

- за всяко животно, включително скала за степенуване;
- подробно описание на същността и степента на наблюдаваните ефекти;
- всички хистопатологични резултати.

Обсъждане на резултатите.

Изводи.

4. **ПРЕПРАТКИ**

Този метод е еднакъв с OECD TG 406.

▼B

Допълнение

ТАБЛИЦА

Степенна скала на Magnusson/Kligman за оценка на реакциите при провокация спластир, натоварен с отровни вещества

0 = няма видими промени

1 = дискретна или на петна еритема

2 = умерена и конфлуираща еритема

3 = интензивна еритема и оток

▼ **M4****Б.7. 28-ДНЕВНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ОРАЛНАТА ТОКСИЧНОСТ ПРИ ГРИЗАЧИ С ПОВТАРЯЩА СЕ ДОЗА**

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоен на Указание за изпитване 407 на ОИСР (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. ОИСР 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 нарушители на функциите на ендокринната система (8). Един от елементите на дейността е да се актуализират съществуващите указания на ОИСР 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 ОИСР (9). Настоящият актуализиран метод за изпитване Б.7. (като равностоен 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 полово зрели 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 ОИСР 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.

▼ M4

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 теглото 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 андрогенни рецептори, но в повечето случаи не е успял да идентифицира ендокринно активни вещества, които слабо засягат естрогенните или андрогенни 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, разчитащ 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 ОИСП (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 въздействията от повтаряща се орална експозиция и може да покаже необходимост от допълнителни дългосрочни изследвания. То може да даде

▼ **M4**

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. Дозирането 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 теглото на използваните животни следва да бъдат минимални и да не превишават 20 % от средното за всеки пол тегло. 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 (± 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.

▼ **M4**

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.

Дозирание

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.

▼ **M4****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, косината, очите, лигавиците, поява на секреция и екскреция, 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.

▼ M4

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 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 предпочитат 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 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. Ако се възприеме нощно гладуване, клиничните биохимични определяния следва да се извършат след провеждането на функционално наблюдение през седмица 4 от изследването.

▼ **M4**

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, иницирано 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 оставят 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 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, епидимите, 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 полепналите 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.

▼ M4

41. В допълнение, две други тъкани могат като опция да бъдат претеглени възможно най-скоро след дисекцията, за да се избегне изсъхването: двойката яйчници (мокро 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 дрениращ възел следва да бъде взет още един лимфен възел в съответствие с опита на лабораторията (15)], периферен нерв (седалищен или голямопещялен), 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.

▼ **M4****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 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 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 тегло 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,

▼ M4

- 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 тегло 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 тегло/промени в телесното тегло,
- 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 тегло при умъртвяване и данни за теглото 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.**Заклучения.*

▼ M4*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 подтиска действието на естествен андрогенен хормон (напр. тестостерон) в организъм на бозайник.

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

Антитиреоидна активност е способността на даден химикал да подтиска действието на естествен тиреоиден хормон (напр. T₃) в организъм на бозайник.

Дозирание 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. T₃) в организъм на бозайник.

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

▼ **M4**

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	
— Тестиси	— Яйчници
— Епидидими	— Матка, включително шийката
— Надбъбречни жлези	— Щитовидна жлеза
— Простата + семенни мехурчета с коагулиращите жлези	
Хистопатология	
— Полови жлези:	— Вагинални намазки
— тестиси и	— Мъжки млечни жлези
— яйчници	— Хипофиза
— Допълнителни полови органи:	
— епидидими,	
— простата + семенни мехурчета с коагулиращите жлези	
— матка, включително шийката	
— Надбъбречна жлеза	
— Щитовидна жлеза	
— Влагалище	
Измерване на хормони	
	— Циркулиращи нива на T ₃ , T ₄
	— Циркулиращи нива на TSH

ПРЕПРАТКИ:

- (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.

▼ **M4**

- (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
- (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.

▼ M4

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 характеризане 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 характеризане 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 експозицията може да бъде от решаващо значение, изпълнението на тези допълнителни дейности не следва да пречи на основния план на изследването.

▼ **M4**

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 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 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 ± 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.

▼ M4

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. 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).

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 зрительното 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 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).

▼ **M4**

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 механистично определени крайни точки, напр. подтискане на холинестеразата от органофосфати, образуване на метхемоглобин от еритроцитотоксични агенти, тиреоидни хормони (T_3 , T_4) 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).

▼ **M4****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 μm и с геометрично стандартно отклонение (σ_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

▼ **M4**

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 ± 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

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 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.).

▼ **M4**

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 уравнисяване 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 уравнисяване 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 каскадния 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 поглъtitел 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 заключения 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.

▼ M4

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. Оценките 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. COHb, CHE 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, лактатдеhidрогеназа, сорбитолдеhidрогеназа, глутаматдеhidрогеназа, и гама-глутамилтранспептидаза).

▼ M4

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).

▼ **M4****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, 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.
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

Надбъбречни жлези	Семенни мехурчета
Костен мозък (и/или прясно фиксиран аспират)	Гръбначен мозък (шийно, гръдно и поясно ниво)
Мозък (включително срезове от главния мозък, малкия мозък и моста)	Далак
[Очи (ретина, оптичен нерв) и клепачи]	Стомах
Сърце	Тестиси
Бъбреци	Тимус
Ларинкс (3 равнища, 1 равнище следва да включва основата на епиглотиса)	Щитовидна жлеза
Черен дроб	Трахея (най-малко 2 равнища, включващи 1 Надлъжен срез през Хребетовидна структура и 1 напречен срез)
Бял дроб (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 нософарингсния канал и назално асоциираната лимфоидна тъкан (NALT))	Всички макроскопски увреждания
Хранопровод	
[Обонятелна луковица]	
Яйчници	

▼ **M4**

41. Белите дробове следва да се отстранят невредими, да се претеглят и третираат 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 нософарингните 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.

▼ **M4**

- 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 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.

▼ **M4**

- 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 (mg/l, mg/m³ 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 (σ_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 пробоземане 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 пробоземането, за разпределението на частиците по размери, и изчисления на MMAD и σ_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).

▼ **M4**

- 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 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 № 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.

▼ M4

- (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, Hameleers 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, етикетирането 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).

▼ M4

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

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

▼B**Б.9. ТОКСИЧНОСТ (ДЕРМАЛНА) С МНОГОКРАТНИ ДОЗИ (28 ДНИ)****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Вж. Общо въведение, част Б, буква А.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Вж. Общо въведение, част Б, буква Б.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Изпитваното вещество се прилага ежедневно в продължение на 28 дни върху кожата, в нарастващи дози при няколко групи експериментални животни, като за всяка група се използва по една доза. По време на експозицията животните се наблюдават всеки ден за появата на симптоми на токсичното действие. Животните, умрели по време на изпитването, се подлагат на аутопсия, а преживелите се аутопсират в края на изпитването.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ**1.6.1. Подготовка**

Животните се настаняват и хранят в лабораторни условия най-малко пет дни преди началото на изпитването. Преди изпитването млади здрави животни се избират по случаен начин и (също случайно) се разпределят на експериментални и контролни групи. Малко преди началото на изпитването се подстригва козината по гръбната част на тялото. Козината може и да се обръсне, но това се прави около 24 часа преди изпитването. Обикновено се налага ежеседмично подстригване или бръснене на козината, като се внимава да не се охлузи кожата. За прилагането на изпитваното вещество следва да се почистят не по-малко от 10 % от повърхността на тялото. За точното определяне на площта от тялото, която следва да се почисти от косми, а също и на размера на покритието е необходимо за се вземе предвид телесната маса на животното. При изпитването на твърди вещества (които могат да се стрият до прахообразно състояние, ако се сметне за необходимо) изпитваното вещество следва добре да се омокри с вода или с подходящ носител, което осигурява добър контакт с кожата. Течните вещества по принцип се прилагат без разреждане. Веществото се прилага ежедневно по пет до седем дни в седмицата.

1.6.2. Условия на изпитване**1.6.2.1. *Опитни животни***

Може да се използват полово зрели плъхове, зайци или морски свинчета. Употребата на други видове е също възможна, но следва да се обоснове.

▼B

В началото на изпитването интервалът в който варират масите на животните, не бива да е по-голям от $\pm 20\%$ от съответната средна стойност.

1.6.2.2. Брой и пол

При всяко ниво на дозиране се използват най-малко 10 животни (пет женски и пет мъжки) със здрава кожа. Женските не бива да са раждали, нито да са бременни. Ако е планирано част от животните да бъдат убивани на междинни етапи от експеримента, първоначалният брой животни следва да се увеличи с толкова, колкото ще бъдат убити преди края на изпитването. Освен това „сателитна“ група от 10 животни (по пет от двата пола) може да се третира с високо ниво на дозата за 28 дни. В продължение на 14 дни след това при тази група се провеждат наблюдения за случаи на обратимост, задържане или забавяне на токсичните ефекти. Използва се също и сателитна контролна група от 10 животни (по пет от двата пола).

1.6.2.3. Нива на дозите

Необходими са най-малко три нива на дозите и една контрола или контрола с носител (ако е използван носител). Експозиционният период следва да бъде поне по шест часа на ден. Прилагането на изпитваното вещество следва да става по едно и също време на деня; интервалите между експозициите се регулират (на една или две седмици), така че да се поддържа постоянно ниво на дозата спрямо телесната маса на животните. Животните от контролната група се третират по същия начин, както и тези от експерименталните групи с тази разлика, че при тях не се прилага изпитваното вещество. Когато за улеснение на дозирането е използван носител, животните от контролната група се третират с носителя по същия начин, както и животните от третираните групи, като количеството на приложението носител съвпада с това, получавано от групата с най-високо ниво на дозата. Най-високото ниво на дозиране следва да води до появата на токсични ефекти, но не и (или не в големи размери) да предизвиква смъртта на животните. При най-ниското ниво на дозата не бива да се наблюдават никакви признаци на токсично действие. Когато съществува използвана оценка за експозицията при хора, най-ниското ниво следва да я надвишава. В идеалния случай междинното ниво на дозата следва да води до минимални видими токсични ефекти. Ако се използват повече от една междинна доза, то техните нива следва да са правилно разпределени в количествено отношение, така че да се получи градация на токсичните ефекти. Случаите на смърт в групите с ниско и междинно ниво на дозата, както и в контролните групи следва да са минимален брой, което би позволило съдържателна оценка на резултатите.

Ако прилагането на изпитваното вещество предизвиква силно дразнене на кожата, концентрациите се намаляват, което може да доведе до намаление или отсъствие на другите ефекти от токсичното действие при високи нива на дозата. Нещо повече, ако кожата е силно разранена, то е необходимо изпитването да се прекрати и да се предприеме нов опит при по-ниски концентрации.

1.6.2.4. Гранично изпитване

Ако предварителното изпитване при ниво на дозата 1 000 mg/kg или при по-висока доза, свързана с възможна експозиция на хора (ако е известна), не доведе до токсични ефекти, то повече изпитвания могат да се смятат за излишни.

1.6.2.5. Период на наблюдение

Експерименталните животни се наблюдават всеки ден за симптоми на токсичното действие. Записват се времето на смъртта, както и времената на поява и изчезване на симптомите.

▼ B

1.6.3. Процедура

Животните следва да се разположат в индивидуални клетки. Третирането с изпитваното вещество в идеалния случай става по седем дни в седмицата в продължение на 28 дни. Животните от всички сателитни групи, предназначени за продължителни наблюдения, се оставят без третиране още 14 дни, при което се проследява възстановяването от токсичните симптоми или тяхното устойчиво задържане. Времето за експозиция следва да бъде поне шест часа на ден.

Изпитваното вещество се прилага на равномерен слой върху площ приблизително 10 % от телесната повърхност. При вещества с висока токсичност покритата площ може да бъде и по-малка, но във всички случаи тя следва да се покрие с колкото е възможно по-тънък и равномерен пласт.

По време на експозицията изпитваното вещество се задържа в контакт с кожата с помощта на марлена превръзка и лепенка, която не дразни кожата. Мястото на прилагане на веществото се покрива допълнително по подходящ начин, така че превръзката и веществото да се задържат стабилно и освен това да се предотврати поглъщането на веществото от животното. За целта могат да се използват приспособления за ограничаване на движенията, но пълното обездвижване не се препоръчва. Може да се използва и „защитен обездвижващ нашийник“.

В края на периода на експозиция останалото изпитвано вещество се отстранява, ако може, с вода или кожата се почиства по друг подходящ начин.

Провежда се ежедневно наблюдение на всички животни и симптомите на токсичното действие се записват заедно с времето на появата им, техните острота и продължителност. Наблюденията следва да включват изменения в кожата и козината, очите и лигавиците, както и промените в дихателната, кръвоносната, автономната и централната нервна система, соматомоторната активност и поведението. Масата на животните следва да се измерва всяка седмица. Препоръчва се също всяка седмица да се измерва и консумацията на храна. Редовното наблюдаване на животните е необходимо и за да се избегне загубата на животни по такива причини, като канибализъм, аутолиза на тъканите или неправилно положение в клетката. В края на проучвателния период всички оцелели животни от основните (несателитните) третиращи групи се подлагат на аутопсия. Умиращите животни, както и животните с признаци на тежък стрес или болка следва да се отстраняват от изпитването в момента, в който са забелязани, да бъдат убивани безболезнено и подлагани на аутопсия.

Изброените по-долу анализи се правят в края на теста на всички животни, включително тези от контролните групи:

- 1) хематологични анализи, които да включват най-малко хематокрит, концентрация на хемоглобина, брой на еритроцитите, общо и диференциално броене на левкоцитите и измерване потенциала на съсирване;
- 2) клинична биохимия на кръвта, в това число поне по един параметър за чернодробна и бъбречна функция: серумна аланин аминотрансфераза (първоначално известна като глутамат пируват трансaminaза), серумна аспаргат аминотрансфераза (първоначално позната като глутамат оксалоацетат трансaminaза), карбамиден азот, албумин, кръвен креатинин, общ билирубин и общ белтък в серума.

Други анализи, които може да са необходими за правилната токсикологична оценка, са следните: калций, фосфор, хлориди, натрий, калий, глюкоза при гладуване, анализ на липиди, хормони, киселинно-основен баланс, метхемоглобин и холинестеразна активност.

▼B

Когато е необходимо, за разширяване на изпитванията върху наблюдаваните ефекти може да се включат и допълнителни клинични биохимични анализи.

1.6.4. **Аутопсия**

Всички животни, участвали в изпитването, следва да се подложат на пълна макроскопска аутопсия. Най-малко черният дроб, бъбреците, надбъбречните жлези и тестисите се претеглят във влажно състояние, колкото е възможно по-бързо след дисекцията (така че да не изсъхват). Някои органи и тъкани, т.е. нормална и третирана кожа, черен дроб, бъбрек, слезка, тестиси, надбъбречни жлези, сърце и критични органи (т.е. онези органи, които показват видими поражения или изменения в размерите) следва да се запазят в подходяща среда за възможно бъдещо хистопатологично изпитване.

1.6.5. **Хистопатологично изпитване**

В групата с високо ниво на дозата, както и в контролната група се правят хистопатологични изпитвания на запазените органи и тъкани. Органите и тъканите, които показват дефекти, свързани с действието на изпитваното вещество при най-високата доза, следва да се изпитват и във всички групи с по-ниски нива на дозиране. При хистологичното изпитване на животните от сателитната група особено внимание се отделя на онези органи и тъкани, при които са наблюдавани ефекти в останалите третиранни групи.

2. **ДАННИ**

Данните се обобщават в таблична форма, като за всяка изпитвана група се дават броят на животните в началото на изпитването и броят на животните, показали различните видове увреждания.

Всички наблюдавани резултати се обработват с подходящ статистически метод. Може да се използва всеки от общоприетите статистически методи.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

3.1. **ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Протоколът от изпитването следва по възможност да съдържа следната информация:

- данни за животните (вид, порода, източник, условия на средата, диета и др.);
- условия на изпитване (включително видът на превръзката: оклузивна или неоклузивна);
- нива на дозиране (в това число и носителя, ако е използван) и концентрации;
- когато е възможно, се указва и нивото, при което не се наблюдават ефекти;
- данни за отговора на токсичното действие по пол и доза;
- време на смъртта в процеса на изпитването или дали животните са преживели до края на изпитването;
- токсични или други ефекти;
- време на наблюдаване на всеки аномален признак и неговото следващо развитие;
- данни за храната и телесната маса;
- използвани хематологични анализи и резултатите от тях;

▼B

- използвани клинични биохимични анализи и резултатите от тях;
- находки при аутопсията;
- детайлно описание на всички хистопатологични находки;
- статистическа обработка на резултатите (когато е възможна);
- обсъждане на резултатите;
- интерпретиране на резултатите.

3.2. **ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ**

Вж. Общо въведение, част Б, буква Г.

4. **ПРЕПРАТКИ**

Вж. Общо въведение, част Б, буква Д.

▼ M7**В.10. ИЗПИТВАНЕ *IN VITRO* ЗА ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ ПРИ БОЗАЙНИЦИ****ВЪВЕДЕНИЕ**

Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на Насоки за изпитване на ОИСП 473 (2016). Той е част от поредица от методи за изпитване от областта на генетичната токсикология. Разработен е документ на ОИСП, съдържащ ясна информация относно изпитванията в областта на генетичната токсикология, и преглед на актуалните изменения на посочените Насоки (1).

Целта на изпитването *in vitro* за хромозомни аберации е да се идентифицират химикали, причиняващи структурни хромозомни аберации в култивирани клетки от бозайници (2) (3) (4). Структурните аберации могат да бъдат два типа: хромозомни и хроматидни. В изследванията *in vitro* за хромозомни аберации може да възникне полиплоидия (включително ендоредупликация). Докато анеугени могат да предизвикат полиплоидия, полиплоидията сама по себе си не е показание за анеугенен потенциал и може просто да показва смущение на клетъчния цикъл или цитотоксичност (5). Това изпитване не е предназначено да измерва анеуплоидия. За откриването на анеуплоидия се препоръчва изпитване *in vitro* за микроядра на клетки (6).

При изпитването *in vitro* за хромозомни аберации могат да се използват култури от установени клетъчни линии или първични клетъчни култури с човешки произход или с произход от гризачи. Използваните клетки следва да се избират въз основа на способността на растеж в културата, стабилността на кариотипа (включително броя на хромозомите) и спонтанната честота на хромозомните аберации (7). Към настоящия момент наличните данни не позволяват да се направят категорични препоръки, но дават възможност да се предполага, че при оценяване на опасностите от химикали е важно да се разглеждат статусът на p53, генетичната (кариотипна) стабилност, капацитетът за поправка на ДНК и произходът (произход от гризачи спрямо човешки произход) на клетките, избрани за изпитване. По този начин ползвателите на настоящия метод за изпитване са насърчавани, с увеличаването на познанията в тази област, да обърнат внимание на влиянието на тези и други клетъчни характеристики върху параметрите на дадена клетъчна линия при откриването на предизвикване на хромозомни аберации.

Използваните определения са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Изпитванията, провеждани *in vitro*, по принцип изискват използването на екзогенен източник на метаболитно активиране, освен когато клетките са с капацитет за метаболизиране по отношение на изпитваните химикали. Екзогенната система на метаболитно активиране не възпроизвежда изцяло *in vivo* условия. Следва внимателно да се избягват условия, които биха довели до изкуствено предизвикани положителни резултати, т.е. хромозомно увреждане, което не е причинено от прякото взаимодействие между изпитваните химикали и хромозомите; такива условия включват промени в рН или осмолалитета (8) (9) (10), взаимодействие с компонентите на средата (11) (12) или прекомерно високи нива на цитотоксичност (13) (14) (15) (16).

Настоящият тест се използва за откриване на хромозомни аберации, които може да са резултат от кластогенни събития. Анализът на предизвикването на хромозомни аберации следва да бъде извършен като се използват клетки в метафаза. Поради това от съществено значение е клетките да претърпят митоза както при третираните, така и при нетретираните култури. За произведени наноматериали може да е необходимо специфично адаптиране на настоящия метод за изпитване, но то не е описано в настоящия метод за изпитване.

Преди използването на метода за изпитване по отношение на смес с цел генериране на данни за планирана регулаторна цел, следва да се разгледа въпросът дали той може да даде адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо. Такива съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа.

▼ **M7****ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО**

Клетъчните култури с човешки произход или с произход от други бозайници се подлагат на експозиция на изпитвания химикал със и без екзогенен източник на метаболитно активиране, освен когато се използват клетки с достатъчен капацитет за метаболизиране (вж. точка 13). На предварително определени интервали след началото на експозицията на клетъчните култури на изпитвания химикал, те се третираат с блокиращ метафазата химикал (напр. колцемид или колхицин), събират се, оцветяват се и клетките в метафаза се анализират под микроскоп за наличието на хроматиден и хромозомен тип аберации.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**Приготвяне***Клетки*

Могат да се използват разнообразни клетъчни линии (например яйчникови клетки от китайски хамстер (CHO), бял дроб от китайски хамстер V79, бял дроб от китайски хамстер (CHL)/IU, ТК6) или първични клетъчни култури, включително и лимфоцити от периферна кръв от човек или от други бозайници. Изборът на използваните клетъчни линии следва да е научно обоснован. Когато се използват първични клетки, от съображения за хуманно отношение към животните следва да се разгледа използването на първични клетки от човешки произход, когато това е осъществимо, и от тях да се вземат проби в съответствие с човешките етични принципи и правната рамка. Човешките лимфоцити от периферна кръв следва да бъдат получени от млади (на приблизителна възраст 18—35 години) индивиди, които не са пушачи, без известни заболявания и за които не е известно наскоро да са били подложени на експозиция на генотоксични агенти (напр. химикали, йонизиращи лъчения) на нива, които биха увеличили фоновата честота на хромозомните аберации. Това би гарантирало ниските и съгласувани стойности на фоновата честота на хромозомни аберации. Базовата честота на хромозомни аберации нараства с възрастта и тази тенденция е по-изразена при индивидите от женски пол, отколкото при индивидите от мъжки пол (17) (18). Броят на донорите следва да бъде посочен, ако се обединят клетките от повече от един донор в обща група за използване. Необходимо е да се докаже, че клетките са преминали през делене от началото на третирането с изпитвания химикал до вземането на проби от клетките. Клетъчните култури се поддържат във фаза на експоненциален растеж (клетъчни линии) или деленето им се стимулира (първични култури от лимфоцити) с оглед експозиция на клетките през различни етапи от клетъчния цикъл, тъй като чувствителността на клетъчните етапи по отношение на изпитваните химикали може да не е известна. Първичните клетки, чието делене трябва да бъде стимулирано с митогенни агенти, обикновено не се синхронизират повече по време на експозиция на изпитвания химикал (напр. човешки лимфоцити след 48-часова митогенна стимулация). Използването на синхронизирани клетки по време на третирането не е препоръчително, но може да бъде приемливо, ако е обосновано.

Среди и условия за отглеждане на културата

За отглеждането на културите трябва да бъдат използвани подходящи среда за отглеждане и инкубационни условия (съдове за отглеждане, влажна атмосфера с 5 % CO₂ ако е целесъобразно, температура на инкубиране от 37 °C). Клетъчните линии следва да се проверяват рутинно за стабилност на модалния брой на хромозомите и отсъствие на замърсяване от *Mycoplasma* (7) (19), и клетките не следва да се използват, ако са замърсени или ако има промени в модалния брой на хромозомите. Нормалната продължителност на клетъчния цикъл на клетъчните линии или първичните култури, използвани в лабораторията, провеждаща изпитването, следва да бъде установена и следва да съответства на публикуваните характеристики на клетките (20).

Приготвяне на културите

Клетъчни линии: размножават се клетки от изходни култури, посяват се в среда за отглеждане с такава посевна гъстота, че клетките в суспензии или в монослоеве да продължат експоненциалния си растеж до събирането (напр. следва да се избягва сливането при клетки, отглеждани в монослоеве).

▼ **M7**

Лимфоцити: цяла кръв, третирана с антикоагулант (напр. хепарин), или изолирани лимфоцити се отглеждат (напр. в продължение на 48 часа за човешки лимфоцити) в присъствието на митоген, [напр. фитохемаглутинин (РНА) за човешки лимфоцити] за предизвикване на клетъчно делене преди експозиция на изпитвания химикал.

Метаболитно активиране

При използването на клетки с недостатъчен ендogenous капацитет за метаболизирани следва да се използват екзогенни метаболизирани системи. Най-често използваната система, която се препоръчва по подразбиране, освен ако няма основание за друго, е постмитохондрична фракция (S9) с добавка на ко-фактор, приготвена от черен дроб на гризачи (обикновено плъхове), третирани с ензимно индуциращи агенти като Ароклор 1254 (21) (22) (23) или съчетание от фенобарбитал и β-нафтофлавон (24) (25) (26) (27) (28) (29). Последното съчетание не противоречи на Стокхолмската конвенция за устойчивите органични замърсители (30) и е доказано, че е също толкова ефективно, колкото Ароклор 1254, за индуцирането на оксидази със смесени функции (24) (25) (26) (28). Фракцията S9 обикновено се използва в концентрации, вариращи от 1 до 2 % (об./об.), но може да се увеличи до 10 % (об./об.) в окончателната среда за изпитване. Използването на продукти, намаляващи митотичния индекс, особено продукти, образуващи комплекси с калция (31), следва да се избягва по време на третирането. Изборът на типа и концентрацията на използваната екзогенна система за метаболитно активиране или метаболитен индуктор може да бъде повлиян от класа химикали, който се изпитва.

Приготвяне на химикала за изпитване

Твърдите изпитвани химикали следва да се подготвят в подходящи разтворители и, ако е необходимо, да се разреждат преди третиране на клетките (вж. точка 23). Течните химикали за изпитване могат да се добавят директно в системата за изпитване и/или да се разреждат преди третирането на системата за изпитване. Газообразните или летливите химикали за изпитване следва да бъдат изпитвани чрез подходящи изменения на стандартните протоколи, като например третиране в запечатани съдове за отглеждане (32) (33) (34). Приготвянето на изпитвания химикал следва да се извърши непосредствено преди третирането, освен ако данните за стабилността показват, че е допустимо съхранение.

Условия на изпитването*Разтворители*

Разтворителят трябва да бъде избран с цел оптимизиране на разтворимостта на изпитваните химикали, без да се оказва негативно влияние върху извършването на изследването, като например промяна на клетъчния растеж, засягане на целостта на изпитвания химикал, реакция със съдовете за отглеждане, нарушаване на системата за метаболитно активиране. Препоръчва се винаги когато е възможно най-напред да се разглежда възможността за използване на вода като разтворител (или среда за отглеждане). Добре утвърдени разтворители са например водата или диметилсулфоксидът. Като цяло органичните разтворители не следва да надвишават 1 % (об./об.), а водните разтворители (физиологичен разтвор или вода) не трябва да превишават 10 % (об./об.) в окончателната среда за третиране. Ако се използват разтворители, които не са добре утвърдени (напр. етанол или ацетон), използването им следва да бъде подкрепено от данни за съвместимостта им с изпитваните химикали и системата за изпитване, както и за това, че не са генотоксични при използваната концентрация. При липса на подкрепящи данни е важно да се включат нетретирани контроли (вж. допълнение 1), за да се докаже, че избраният разтворител не предизвиква никакви неблагоприятни или кластогенни ефекти.

Измерване на клетъчната пролиферация и цитотоксичността и избор на концентрации на третиране

При определяне на най-високата концентрация на изпитвания химикал следва да се избягват концентрациите, които могат да доведат до изкуствено предизвикан положителен отклик, като например предизвикващите прекомерна цитотоксичност (вж. точка 22), утаяване в средата за отглеждане (вж. точка 32) или явни промени в рН или осмолалитета (вж. точка 5). Ако изпитваният химикал предизвиква явна промяна в рН на

▼ M7

средата към момента на добавянето, рН може да бъде коригиран чрез буферизиране на окончателната среда за третиране, за да се избегнат изкуствено предизвикани положителни резултати и да се поддържат подходящи условия за отглеждане.

Извършват се измервания на пролиферацията на клетките, за да се гарантира, че по време на изпитването достатъчно на брой третирани клетки са претърпели митоза, както и че третираната са извършени при подходящи нива на цитотоксичност (вж. точки 18 и 22). Цитотоксичността следва да се определи в главния опит със и без метаболитно активиране, като се използва подходяща индикация на клетъчната смърт и растеж. Въпреки че оценката на цитотоксичността в първоначално изпитване може да бъде полезна за по-добро определяне на концентрациите, които ще се използват в главния опит, първоначалното изпитване не е задължително. Ако се извършва, то не следва да заменя измерването на цитотоксичността в главния опит.

Методите относително удвояване на популации (RPD) или „относителен ръст в количеството клетки (RICC)“ са подходящи за оценка на цитотоксичността в цитогенетични изследвания (13) (15) (35) (36) (55) (вж. допълнение 2 за формули). В случай на продължителни периоди на третиране и пробовземане след началото на третирането, по-дълги от 1,5 пъти от нормалната продължителност на клетъчния цикъл (т.е., за период общо над 3 клетъчни цикъла) RPD може да подцени цитотоксичността (37). При тези обстоятелства RICC може да бъде по-добър измерител, но оценката на цитотоксичността след 1,5 пъти нормалната продължителност на клетъчния цикъл би представлявала полезна прогнозна оценка с използването на RPD.

Въпреки че митотичният индекс (MI) е измерител за цитотоксичното/цитостатичното действие върху лимфоцитите в първични култури, той се влияе от това кога е измерен след третирането, от използвания митоген и от евентуални прекъсвания на клетъчния цикъл. Независимо от това MI е приемлив, тъй като другите измервания на цитотоксичността могат да се окажат обременителни и непрактични и е възможно да са неприложими за прицелната популация от лимфоцити, нарастваща в резултат от стимулиране с РНА.

Независимо от това, че препоръчителните параметри за цитотоксичността са RICC и RPD за клетъчни линии и MI за първични култури от лимфоцити, други показатели (например клетъчната цялост, апоптозата, некрозата, клетъчният цикъл) биха могли да предоставят полезна допълнителна информация.

Следва да бъдат оценени най-малко три концентрации на изпитване (без да се включват контролите на разтворител и положителните контроли), които отговарят на критериите за приемливост (подходяща цитотоксичност, брой на клетки и т.н.). Независимо от типа на клетките (клетъчни линии или първични култури от лимфоцити), при всяка изпитвана концентрация могат да се използват третирани култури с повторения или без повторение. Макар да се препоръчва използването на култури с повторение, използването на култури без повторение също е приемливо, при условие че е преброен същият общ брой клетки при културата без повторение и при културата с повторение. Използването на култури без повторение е от особено значение в случаите, когато се оценяват повече от 3 концентрации (вж. точка 31). Резултатите, получени за културите с независими повторения при дадена концентрация, могат да бъдат обединени за анализа на данните (38). За изпитваните химикали, които показват слаба цитотоксичност или които не показват цитотоксичност, обичайно са подходящи приблизително 2 до 3-кратни концентрационни интервали. Там, където се среща цитотоксичност, избраните изпитвани концентрации следва да са в обхват, в който се получава цитотоксичност, както е описано в точка 22, и да включват концентрации, при които има умерена, слаба и нулева цитотоксичност. Множество изпитвани химикали показват стръмни криви концентрация-отклик и за да се получат данни за слаба и умерена

▼ **M7**

цитотоксичност, или за да се проучи подробно връзката доза-отклик, е необходимо да се използват по-близко разположени концентрации и/или над три концентрации (култури без повторение или с повторения), по-специално в ситуации, при които се изисква повтаряне на опита (вж. точка 47).

Ако максималната концентрация е базирана на цитотоксичност, най-високата концентрация следва да има за цел постигане на $55 \pm 5\%$ цитотоксичност при използване на препоръчаните параметри за цитотоксичност (т.е. намаляване при RICC и RPD за клетъчни линии и намаляване при MI за първични култури от лимфоцити до $45 \pm 5\%$ от паралелната отрицателна контрола). Трябва да се внимава при тълкуването на положителните резултати, които се срещат само в горния край на диапазона $55 \pm 5\%$ цитотоксичност (13).

За малко разтворимите изпитвани химикали, които не са цитотоксични при концентрации, по-ниски от най-ниската неразтворима концентрация, най-високата анализирана концентрация трябва да предизвиква помътняване или утайка, видима с невъоръжено око или с помощта на инвертен микроскоп в края на третирането с изпитвания химикал. Дори ако цитотоксичността се наблюдава над най-ниската неразтворима концентрация, препоръчително е да се извърши изпитване само при една концентрация, която предизвиква помътняване или е с видима утайка, тъй като от утайката могат да се получат изкуствено предизвикани въздействия. При концентрацията, водеща до образуването на утайка, трябва да се вземат мерки, за да се гарантира, че утайката не пречи на провеждането на изпитването (напр. оцветяване или броене). Определянето на разтворимостта в средата за отглеждане преди началото на опита може да се окаже полезно.

Ако не се наблюдава утайка или ограничаваша цитотоксичност, най-високата изпитвана концентрация следва да съответства на 10 mM, 2 mg/ml или 2 µl/ml, в зависимост от това коя от стойностите е най-ниска (39) (40) (41). Когато изпитваният химикал не е с определен състав, например вещество с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологичен материал (UVCB) (42), екстракт от околната среда и др., може да е необходимо стойността на най-високата концентрация да е по-голяма (напр. 5 mg/ml), при липсата на достатъчна цитотоксичност, за да се увеличи концентрацията на всеки от компонентите. Следва да се отбележи обаче, че тези изисквания могат да се различават по отношение на фармацевтични продукти за хуманна употреба (43).

Контроли

Паралелните отрицателните контроли (вж. точка 15), състоящи се само от разтворител в средата за третиране, и третирани по същия начин като културите, които се третират, следва да се включат за всяко време на събиране.

Паралелните положителни контроли са необходими за доказване на способността на лабораторията за идентифициране на кластогени при условията на използвания протокол за изпитването и на ефективността на екзогенната система за метаболитно активиране, когато е приложимо. Примери за положителни контроли са дадени в таблица 1 по-долу. Като положителни контроли могат да бъдат използвани алтернативни химикали, ако това е обосновано. Тъй като изпитванията *in vitro* върху клетки от бозайници за генетична токсичност са достатъчно стандартизирани, използването на положителни контроли може да се ограничи до кластоген, изискващ метаболитно активиране. При условие че това се извършва паралелно с изпитването без активиране при същата продължителност на третирането, откликът на тази единична положителна контрола ще докаже както активността на системата за метаболитно активиране, така и способността за реагиране на системата за изпитване. Независимо от това, дългосрочното третиране (без S9) следва да има своя собствена положителна контрола, тъй като продължителността на третирането ще се различава от тази при изпитването, при което се използва метаболитно активиране. Всяка положителна контрола следва да бъде използвана при една или повече концентрации, които се очаква да породят възпроизводими и откриваеми увеличения спрямо фона, за да се докаже чувствителността на системата за изпитване (т.е. ефектите са ясни, но не разкриват непосредствено на четящото устройство идентичността на кодираните предметни стъкла), и откликът следва да не бъде накърнен от цитотоксичност, надхвърляща границите, посочени в метода за изпитване.

▼ **M7**

Таблица 1.

Препоръчителни референтни химикали за оценка на пригодността на лабораторията и за подбор на положителни контроли.

Категория	Химикал	CASRN
1. Кластогени, активни без метаболитно активиране		
	Метилметансулфонат	66-27-3
	Митомицин С	50-07-7
	4-нитрохинолин- <i>N</i> -оксид	56-57-5
	Цитозин арабинозид	147-94-4
2. Кластогени, изискващи метаболитно активиране		
	Бензо(а)пирен	50-32-8
	Циклофосфамид	50-18-0

ПРОЦЕДУРА**Третиране с изпитвания химикал**

Пролифериращите клетки се третират с изпитвания химикал при наличието и в отсъствието на система за метаболитно активиране.

Време за събиране на културата

За задълбочена оценка, която ще бъде необходима за заключение за отрицателни резултати следва да са спазени всичките три от следните опитни условия с използване на краткосрочно третиране със и без метаболитно активиране и дългосрочно третиране без метаболитно активиране (вж. точки 43, 44 и 45):

- Клетките следва да бъдат подложени на експозиция на изпитвания химикал без метаболитно активиране в продължение на 3 до 6 часа, и след време, равно на около 1,5 пъти от нормалната продължителност на клетъчния цикъл след началото на третирането (18) от тях следва да се вземе проба,
- Клетките следва да бъдат подложени на експозиция на изпитвания химикал с метаболитно активиране, в продължение на 3 до 6 часа, и след време, равно на около 1,5 пъти от нормалната продължителност на клетъчния цикъл след началото на третирането (18) от тях следва да се вземе проба,
- Клетките следва да бъдат подложени на експозиция непрекъснато без метаболитно активиране до вземането на проба след време, равно на около 1,5 пъти от нормалната продължителност на клетъчния цикъл. Някои химикали (напр. нуклеозидни аналози) могат по-лесно да бъдат открити при третиране/периоди на пробовземане, по-дълги от 1,5 пъти от нормалната продължителност на клетъчния цикъл (24).

В случай че някое от посочените по-горе опитни условия води до положителен отклик, може да не се наложи изследване на никоя от останалите схеми на третиране.

Приготвяне на хромозомите

Клетъчните култури се третират с колцемид или колхицин обикновено в продължение на един до три часа преди събирането. Всяка клетъчна култура се събира и обработва отделно за приготвянето на хромозомите. Приготвянето на хромозомите включва хипотонично третиране на клетките, фиксиране и оцветяване. При еднослойните култури е възможно към края на третирането с продължителност 3—6 часа да присъстват митотични клетки (които се идентифицират като кръгли и отделящи се от повърхността). Тъй като тези митотични клетки се отделят лесно, те могат да се загубят при премахване на средата, съдържаща изпитвания химикал. Ако има доказателство за значително увеличаване на броя на митотичните

▼ M7

клетки в сравнение с контролите, вероятно указващо блокиране на митозата, тогава в момента на събирането клетките следва да се събират чрез центрофугиране и да се добавят обратно към културите, за да се избегне загубата на клетки, които са в митоза и са подложени на риск от хромозомни аберации.

Анализ

Всички предметни стъкла, включително и тези на положителните и отрицателните контроли, следва да се кодират независимо едно от друго преди микроскопския анализ за хромозомни аберации. Процедурите по фиксиране често водят до загуба на хромозоми в част от клетките в метафаза и следователно преброените клетки следва да съдържат известен брой центромери, равен на модалния брой ± 2 .

Следва да се преброят най-малко 300 добре разнесени метафази за всяка концентрация и контрола, за да се направи заключение, че даден изпитван химикал е ясно отрицателен (вж. точка 45). Когато се използват култури с повторения, посочените 300 клетки следва да бъдат разделени поравно между повторенията. Когато се използва култура без повторение на концентрация (вж. точка 21), следва да се преброят най-малко 300 добре разнесени метафази в тази култура без повторение. Преброяването на 300 клетки има предимството, че се увеличава статистическата мощност на теста и освен това рядко се наблюдават нулеви стойности (очаква се те да са само 5 %) (44). Броят на преброените метафази може да бъде намален, когато се наблюдава голям брой клетки с хромозомни аберации и изпитваният химикал се смята за ясно положителен.

Следва да се преброят клетките със структурна хромозомна аберация (или аберации) със и без празнини. Разкъсванията и празнините са определени в допълнение 1 съгласно (45) (46). Хроматидният и хромозомният тип аберации следва да се отчитат поотделно и да се класифицират по подтипове (разкъсвания, обмени). Процедурите, използвани в лабораториите, следва да гарантират, че анализът на хромозомните аберации се извършва от добре обучени преброители и че му е направена партньорска оценка, ако е подходящо.

Въпреки че целта на изпитването е да се открият структурни хромозомни аберации, от значение е да се регистрират честотите на полиплоидия и на ендоредупликация, когато се наблюдават тези събития. (Вж. точка 2).

Пригодност на лабораторията

За да се установи наличието на достатъчно опит по отношение на изпитването преди рутинното изпитване, лабораторията следва да е извършила поредица от опити с действащи чрез различни механизми положителни референтни химикали, чрез използване на различни отрицателни контроли (използване на различни разтворители/носител). Този положителен и отрицателен отклик при контролите следва да съответства на литературата. Това не се прилага за лаборатории, които разполагат с опит, т.е. които разполагат с налична база данни за предходни периоди, както е определено в точка 37.

Подбрани химикали за положителни контроли (вж. таблица 1 в точка 26) следва да бъдат изследвани с краткосрочно и дългосрочно третиране в отсъствието на метаболитно активиране, и също така с краткосрочно третиране с метаболитно активиране, за доказване на пригодността за откриване на кластогенни химикали и за определяне на ефективността на системата за метаболитно активиране. Следва да бъде избран обхват от концентрации на химикалите от подбора така, че да се получават възпроизводими и свързани с концентрацията увеличения над фоните стойности с цел да се демонстрират чувствителността и динамичният обхват на системата за изпитване.

▼ **M7****Данни за контролите за предходни периоди**

Лабораторията следва да установи:

- Размах и разпределение при положителните контроли от предходни периоди,
- Размах и разпределение при отрицателните (без третиране и за разтворител) контроли от предходни периоди.

При първото придобиване на данни за разпределението при отрицателните контроли от предходни периоди паралелните отрицателни контроли следва да бъдат съобразени с публикуваните данни за контролите, когато такива са налице. При добавяне на повече опитни данни към разпределението при контролите паралелните отрицателни контроли следва в идеалния случай да бъдат в рамките на граници за контрол 95 % на това разпределение (44) (47). Базата данни с отрицателни контроли от предходни периоди на лабораторията следва първоначално да се създаде с минимум 10 опита, но е за предпочитане тя да се състои най-малко от 20 опита, проведени при сравними опитни условия. Лабораториите трябва да използват методи за контрол на качеството, като например контролни карти (напр. С-карти или карти за средна стойност (\bar{X}) (48)), за определяне на варирането на данните им за положителните и отрицателните контроли, и за доказване, че методологията е „под контрол“ в техните лаборатории (44). В литературата (47) могат да се намерят допълнителни препоръки относно начина на създаване и използване на данни от предходни периоди (т.е. критерии за включване и изключване на данни в данните за предходни периоди и критериите за приемливост за даден опит).

Всички промени в опитния протокол следва да бъдат разглеждани от гледна точка на тяхната съгласуваност със съществуващите бази данни на дадената лаборатория за контролите за предходни периоди. Всички значителни несъответствия следва да водят до създаването на нова база данни за контролите за предходни периоди.

Данните за отрицателните контроли следва да включват броя на клетките с хромозомни аберации при култури без повторение или сбора за културите с повторения, както е описано в точка 21. Паралелните отрицателни контроли в идеалния случай следва да бъдат в рамките на граници за контрол 95 % от разпределението от базата данни на дадената лаборатория за отрицателните контроли за предходни периоди (44) (47). Когато данните за паралелните отрицателни контроли попадат извън 95 %-ните граници за контрол, те могат да бъдат приемливи за включване в разпределението при контролите от предходни периоди, при условие че тези данни не са екстремални стойности, силно различаващи се от нормалните, и има доказателства, че системата за изпитване е „под контрол“ (вж. точка 37), както и доказателства за липса на техническа или човешка грешка.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Представяне на резултатите**

Следва да бъде оценен процентът на клетки със структурна хромозомна аберация (или аберации). Хроматидният и хромозомният тип аберации, класифицирани по подтипове (разкъсвания, обмени), следва да бъдат изброени поотделно със съответния брой и честоти за опитните и контролните култури. Празнините се записват и протоколират отделно, но не се включват в общата честота на аберациите. Процентът на полиплоидия и/или ендоредуплицирани клетки се протоколира, ако е наблюдаван.

Следва също да се протоколират паралелните измервания на цитотоксичността за всички третиране, отрицателни и положителни контролни култури в главния опит (или главните опити) за аберации.

Следва да се предоставят данни за отделните култури. В допълнение към това всички данни следва да бъдат обобщени в табличен вид.

Критерии за приемливост

Приемливостта на дадено изпитване се основава на следните критерии:

- Паралелната отрицателна контрола се счита за приемлива за допълване към базата данни на дадената лаборатория за отрицателните контроли за предходни периоди, както е описано в точка 39.

▼ **M7**

- Паралелните положителни контроли (вж. точка 26) трябва да предизвикват отклици, които са съвместими с генерираните в базата данни за положителните контроли за предходни периоди, и да генерират статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола.
- Критериите за клетъчна пролиферация в контролата на разтворител трябва да бъдат спазени (точки 17 и 18).
- Всичките три опитни условия са били подложени на изпитване, освен ако едно от тях е довело до положителни резултати (вж. точка 28).
- Достатъчен брой клетки и концентрации са годни за анализ (точки 31 и 21).
- Критериите за избор на най-високата концентрация са съвместими с описаните в точки 22, 23 и 24.

Оценка и тълкуване на резултатите

При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно положителен, ако в някое от опитните условия (вж. точка 28):

- а) при най-малко една от изпитваните концентрации се наблюдава статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола,
- б) увеличението е свързано с дозата при оценка, извършена с подходящ трендов тест,
- в) някой от резултатите е извън разпределението на данните за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. на основата на разпределение на Поасон с граници за контрол 95 %; вж. точка 39).

Ако са изпълнени всички тези критерии се смята, че изпитваният химикал може да предизвика хромозомни аберации в култивирани клетки от бозайници в тази система за изпитване. Препоръки за най-подходящите статистически методи могат да се намерят в литературните източници (49) (50) (51).

При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно отрицателен, ако във всички изследвани опитни условия (вж. точка 28):

- а) в никоя от изпитваните концентрации не се наблюдава статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола,
- б) няма увеличение, свързано с дозата при оценка, извършена с подходящ трендов тест,
- в) всички резултати са в рамките на разпределението на данните за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. на основата на разпределение на Поасон с граници за контрол 95 %; вж. точка 39).

Тогава се смята, че изпитваният химикал не може да предизвика хромозомни аберации в култивирани клетки от бозайници в тази система за изпитване.

Няма изискване за потвърждаване на ясно положителен или ясно отрицателен отклик.

В случай че откликът не е нито ясно отрицателен, нито ясно положителен, както е описано по-горе, или с цел подпомагане на установяването на биологичната относимост на даден резултат, данните следва да се оценяват чрез експертна оценка и/или чрез допълнителни изследвания. Преброяването на допълнителни клетки (когато е уместно) или извършването на опит с повторение с възможност за използване на изменени опитни условия (напр. интервал на разполагане на концентрациите, други условия на метаболитно активиране (т.е. концентрация на S9 или производ на S9)) могат да се окажат полезни.

В редки случаи дори след допълнителни изследвания наборът от данни не позволява стигането до заключение за положителни или отрицателни резултати и следователно за отклика на изпитвания химикал се заключава, че е неясен.

▼ **M7**

Едно увеличение в броя на полиплоидните клетки може да показва, че изпитваните химикали имат потенциал да инхибират митотични процеси и да предизвикват бройни хромозомни аберации (52). Увеличението в броя на клетки с ендоредуплицирани хромозоми може да е показателно за това, че изпитваните химикали имат потенциала да инхибират развитието на клетъчния цикъл (53) (54) (вж. точка 2). Следователно броят на полиплоидните клетки и броят на клетките с ендоредуплицирани хромозоми следва да се записват поотделно.

Протокол от изпитването

Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал:

- източник, номер на партидата, крайна дата за употреба, ако има такава
- стабилност на самия изпитван химикал, ако е известна;
- разтворимост и стабилност на изпитвания химикал в разтворител, ако са известни.
- измерване на рН, осмолалитет и утайка в средата за отглеждане, към която е добавен изпитваният химикал, когато е уместно.

Вещество с една съставка:

- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- химична идентификация, като наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, SMILES или InChI код, структурна формула, чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и др.

Вещество, включващо повече съставки, UVCB и смеси:

- характеризирани, доколкото е възможно, от химическата идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Разтворител:

- обосновка на избора на разтворител.
- следва също да бъде посочено и процентното съдържание на разтворителя в окончателната среда за отглеждане.

Клетки:

- тип и източник на клетките
- кариотипни особености и пригодност на използвания тип клетки;
- за клетъчни линии — отсъствие на микоплазма;
- за клетъчни линии — информация за продължителността на клетъчния цикъл, времето за удвояване или индекса на пролиферация;
- пол на донорите на кръв, възраст и всякаква относима информация по отношение на донор, цяла кръв или изолирани лимфоцити, използван митоген;
- за клетъчни линии — брой пасажи, ако е наличен;
- за клетъчни линии — методи за поддържане на клетъчните култури;
- за клетъчни линии — модален брой на хромозомите.

▼ M7*Условия на изпитването:*

- идентичност и концентрация на химикала, блокиращ метафазата, и времетраене на експозицията на клетките;
- концентрация на изпитвания химикал, изразена като крайна концентрация в средата за отглеждане (напр. μg или mg/ml или mM от среда за отглеждане).
- обосновка за избора на концентрациите и броя на културите, в т.ч. напр. данни за цитотоксичността и ограничения, свързани с разтворимостта;
- състав на средите, концентрация на CO_2 , ако е приложимо, влажност;
- концентрация (и/или обем) на разтворителя и изпитвания химикал, добавени в средата за отглеждане;
- температура на инкубиране;
- време на инкубиране;
- времетраене на третирането;
- време на събиране след третирането;
- гъстота на клетките при посяване, ако е уместно;
- тип и състав на системата за метаболитно активиране (източник на S9, метод на приготвяне на S9 микс, концентрация или обем на S9 микс и S9 в окончателната среда за отглеждане, контрол на качеството на S9);
- химикали за положителни и за отрицателни контроли, крайни концентрации за всяко условие на третиране;
- методи на подготовка на предметното стъкло и използвана техника на оцветяване;
- критерии за приемливост на изследванията;
- критерии за преброяване на аберациите;
- брой на анализирани метафази;
- методи за измерване на цитотоксичността;
- всякаква допълнителна информация, относима към цитотоксичността и използвания метод;
- критерии за считане на изследванията за положителни, отрицателни или неясни;
- методи, използвани за определяне на pH, осмолалитета и утайката.

Резултати:

- броят на третираните клетки и броят на събраните клетки за всяка култура, когато се използват клетъчни линии
- измервания на цитотоксичността, напр. RPD, RICC, MI, други наблюдения, ако има такива;
- информация за продължителността на клетъчния цикъл, времето за удвояване или индекса на пролиферация при клетъчни линии;
- признаци на утаяване и час на определяне;

▼ M7

- определение за аберации, в т.ч. празнини;
- брой на преброените клетки, брой на клетките с хромозомни аберации и тип на хромозомните аберации, дадени отделно за всяка третирана и контролна култура, като се включват празнини и без празнини;
- изменения в плоидността (полиплоидни клетки и клетки с ендоредуплицирани хромозоми, представени поотделно), ако се наблюдават;
- зависимостта концентрация—отклик, където е възможно;
- паралелни данни от отрицателни (разтворител) и положителни контроли (концентрации и разтворители);
- данни от отрицателни (разтворител) и положителни контроли за предходни периоди, с размах, средни стойности и стандартни отклонения и 95 % граници за контрол за разпределението, както и брой данни;
- статистически анализи; р-стойности, ако има такива.

Обсъждане на резултатите.

Заклучения.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Evans, H.J. (1976), „Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens“, in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 1-29
- (3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), „The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture“ in *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. *et al.* (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, pp. 427-432.
- (4) Galloway, S.M. *et al.* (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
- (5) Muehlbauer, P.A. *et al.* (2008), „Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods“, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pp. 318-327.
- (6) Глава Б.49 от настоящото приложение: *Изпитване in vitro за микроядра на клетки от бозайници.*
- (7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.
- (8) Scott, D. *et al.* (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, pp. 147-204.
- (9) Morita, T. *et al.* (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pp. 297-305.
- (10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.

▼ M7

- (11) Long, L.H. *et al.* (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.
- (12) Nesslany, F. *et al.* (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitriro-triacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pp. 439-452.
- (13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191-201.
- (14) Kirkland, D. *et al.* (2005), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, pp. 1-256.
- (15) Greenwood, S. *et al.* (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pp. 36-44.
- (16) Hilliard, C.A. *et al.* (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pp. 316-326.
- (17) Hedner K. *et al.* (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, pp. 305-309.
- (18) Ramsey M.J. *et al.* (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, pp. 95-106.
- (19) Coecke S. *et al.* (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261-287.
- (20) Henderson, L. *et al.* (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, pp.163-167.
- (21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pp. 347-363.
- (22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.
- (23) Natarajan, A.T. *et al.* (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Research*, Vol. 37/1, pp. 83-90.
- (24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277-290.
- (25) Ong, T.-m. *et al.* (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55-65.
- (26) Elliot, B.M. *et al.* (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175-177.

▼ M7

- (27) Matsushima, T. *et al.* (1976), „A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“, in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (28) Galloway, S.M. *et al.* (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 241-261.
- (29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28/1, pp. 51-59.
- (30) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). На разположение на адрес: <http://www.pops.int/>.
- (31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pp. 225-8.
- (32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooley (1982), „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids“, in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.
- (33) Zamora, P.O. *et al.* (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.
- (34) Asakura, M. *et al.* (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.
- (35) Lorge, E. *et al.* (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.
- (36) Galloway, S. *et al.* (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 77-83.
- (37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, pp. 86-87.
- (38) Richardson, C. *et al.* (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (39) OECD (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Предоставя се при поискване.
- (40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, pp. 32-56.
- (41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

▼ M7

- (42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>.
- (43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. На разположение на адрес: <https://federalregister.gov/a/2012-13774>.
- (44) OECD (2014), Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.
- (45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.
- (46) Scott, D. *et al.* (1990), „Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*“, in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.
- (47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.
- (49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.
- (50) Galloway, S.M. *et al.* (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
- (51) Richardson, C. *et al.* (1989), „Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays“, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 29-46.
- (53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pp. 403-413.
- (54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin — induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pp. 1362-1364.
- (55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 312, pp. 139-149.

▼ M7*Допълнение 1*

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Анеуплоидия: всяко отклонение от обичайния диплоиден (или хаплоиден) брой на хромозомите с една или повече от една хромозома, но не и с цял набор (или набори) от хромозоми (полиплоидия).

Аптоза: програмирана клетъчна смърт, характеризираща се с редица етапи, водещи до разпадане на клетките на мембраносвързани частици, които впоследствие се елиминират чрез фагоцитоза или фрагментация.

Клетъчна пролиферация: увеличение на броя на клетките в резултат на митотично клетъчно делене.

Химикал: вещество или смес.

Хроматидно разкъсване: прекъсване на отделна хроматида, при което има ясно изразена несъосност на една от хроматидите.

Хроматидна празнина: неоцветена област (ахроматично увреждане) на отделна хроматида, с минимална несъосност на хроматидата.

Хроматиден тип аберация: структурно увреждане на хромозомата, изразяващо се в разкъсване на единични хроматиди или разкъсване и повторно съединяване между хроматиди.

Хромозомен тип аберация: структурно увреждане на хромозомата, изразяващо се в разкъсване или разкъсване и повторно съединяване на двете хроматиди на идентично място.

Кластоген: всеки химикал, който причинява структурни хромозомни аберации в популации от клетки или еукариотни организми.

Концентрации: отнася се за крайните концентрации на изпитвания химикал в средата за отглеждане.

Цитотоксичност: за изследванията, обхванати от настоящия метод за изпитване, при които се използват клетъчни линии, цитотоксичността се определя като намаляване на относителното удвояване на популации (RPD) или относителен ръст в количеството клетки (RICC) на третираните клетки в сравнение с отрицателната контрола (вж. точка 17 и допълнение 2). за изследванията, обхванати от настоящия метод за изпитване, при които се използват първични култури от лимфоцити, цитотоксичността се определя като намаляване на митотичния индекс (MI) на третираните клетки в сравнение с отрицателната контрола (вж. точка 18 и допълнение 2).

Ендоредупликация: процес, при който след S-период на удвояване на ДНК ядрото не навлиза в митоза, а започва друг S-период. Резултатът е хромозоми с 4, 8, 16, ... хроматиди.

Генотоксичен: общ термин, обхващащ всички видове увреждания на ДНК или на хромозоми, включително разкъсвания, делеции, адукти, изменения на нуклеотиди и връзки, прегрупирания, генни мутации, хромозомни аберации и анеуплоидия. Не всички типове генотоксични ефекти водят до мутации или трайно увреждане на хромозомите.

Митотичен индекс: отношението на клетките в метафаза, разделени на общия брой клетки, наблюдавани в дадена клетъчна популация; показател за степента на пролиферация на тази популация.

Митоза: делене на клетъчното ядро, обикновено разделено на профаза, прометафаза, метафаза, анафаза и телофаза.

Мутагенен: води до наследствена промяна на ДНК последователност(и) на базовите двойки в гени, или на структурата на хромозоми (хромозомни аберации).

▼ M7

Бройна аберация: промяна в броя на хромозомите в сравнение с нормалния брой, характерен за използваните клетки.

Полипloidия: бройни хромозомни аберации в клетки или организми, включващи цял набор (набори) от хромозоми, за разлика от аберациите в отделна хромозома или хромозоми (анеупloidия).

Статус на p53: Белтъкът p53 е включен в регулирането на клетъчния цикъл, апоптозата и поправката на ДНК. Клетките с дефицит на функционалния белтък p53, неспособни да блокират клетъчния цикъл или да елиминират увредените клетки чрез апоптоза или чрез други механизми (напр. предизвикване на поправка на ДНК), свързани с функциите на p53, в отговор на увреждане на ДНК, следва теоретично да са по-податливи на генни мутации или хромозомни аберации.

Относителен ръст в количеството клетки (RICC): увеличението на броя на клетките в културите, подложени на експозиция на химикал, спрямо увеличението в нетретирани култури, като отношението е изразено в проценти.

Относително удвояване на популации (RPD): увеличението на броя на удвояванията на популации в културите, подложени на експозиция на химикал, спрямо увеличението в нетретирани култури, като отношението е изразено в проценти.

S9 фракция от черен дроб: супернатант от хомогенат на черен дроб след центрофугиране при 9 000 g, т.е. необработен екстракт от черен дроб.

S9 микс: микс от S9 фракцията от черен дроб и кофактори, необходими за действието на метаболитни ензими.

Контрола на разтворител: общ термин за определяне на контролните култури, които са само на разтворителя, който се използва за разтвяране на изпитвания химикал.

Структурна аберация: промяна в хромозомната структура, която се открива при микроскопско изследване на етапа на метафаза на клетъчното делене, наблюдавана във вид на делеции и фрагменти, вътрешнохромозомни или междухромозомни преустройства.

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

Нетретирани контроли: култури, които не се третират (т.е. без изпитвания химикал и без разтворител), но се обработват паралелно по същия начин като културите, които се третират с изпитвания химикал.

▼ M7

Допълнение 2

ФОРМУЛИ ЗА ОЦЕНКА НА ЦИТОТОКСИЧНОСТТА

Митотичен индекс (MI):

$$MI(\%) = \frac{\text{Брой на митотични клетки}}{\text{Общ брой на отчетените клетки}} \times 100$$

Относителният ръст в количеството клетки (RICC) и относителното удвояване на популации (RPD) се препоръчват, тъй като и при двете се отчита делът на клетъчната популация, претърпяла делене.

$$RICC(\%) = \frac{(\text{Ръст на броя на клетки в третираните култури(Началната-финал)})}{(\text{Ръст на броя на клетките в контролните култури(Началната-финал)})} \times 100$$

$$RPD(\%) = \frac{(\text{Брой удвоявания на популацията в третираните култури})}{(\text{Брой удвояване на населението в контролните култури})} \times 100$$

където:

Удвояване на популации = $[\log(\text{брой на клетките след третиране} \div \text{първоначален брой на клетките})] \div \log 2$

Например, RICC или RPD на стойност 53 % показва 47 % цитотоксичност/цитостаза, а 55 % цитотоксичност/цитостаза, измерена с MI, означава, че действителният MI е 45 % от контролата.

Във всички случаи броят на клетките следва да бъде измерен преди третирането и да е един и същ при културите, подлежащи на третиране, и при отрицателните контролни култури.

Въпреки че параметърът RCC (т.е. брой на клетките в третираните култури/брой на клетките в контролните култури) е бил използван като параметър за цитотоксичност в миналото, той вече не се препоръчва, тъй като може да подцени цитотоксичността.

В отрицателни контролни култури удвояването на популацията следва да бъде съвместимо с изискването за вземане на проби от клетки след третирането, след време, равно на около 1,5 пъти от нормалната продължителност на клетъчния цикъл, и митотичният индекс следва да бъде достатъчно по-висок, за да се получи достатъчен брой клетки в митоза и надеждно да се изчисли 50 % намаление.

▼ M7**Б.11. ИЗПИТВАНЕ ЗА ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ В КОСТЕН МОЗЪК НА БОЗАЙНИЦИ****ВЪВЕДЕНИЕ**

Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на Насоки за изпитване на ОИСП 475 (2016). Той е част от поредица от методи за изпитване от областта на генетичната токсикология. Разработен е документ на ОИСП, съдържащ ясна информация относно изпитванията в областта на генетичната токсикология, и преглед на актуалните изменения на посочените Насоки (1).

In vivo изпитването за хромозомни аберации в костен мозък на бозайници е от особена значимост за оценка на генотоксичността, тъй като, въпреки че могат да варират според животинския вид, факторите за *in vivo* метаболизма, фармакокинетиката и процесите на поправка на ДНК са активни и допринасят за отклика. *In vivo* изследване също е от полза за по-нататъшното проучване на генотоксичността, установена чрез *in vitro* система.

In vivo изпитването на бозайници за хромозомни аберации се използва за откриване на структурни хромозомни аберации, предизвикани от изпитвани химикали в клетки от костен мозък на животни, обикновено гризачи (2) (3) (4) (5). Структурните хромозомни аберации могат да бъдат два вида: хромозомни или хроматидни. Макар че повечето аберации, предизвикани от генотоксични химикали, са от хроматиден тип, срещат се и такива от хромозомен тип. Хромозомните увреждания и свързаните с тях събития са причината за множество генетични болести у човека и има съществени доказателства, че когато посочените увреждания и свързаните с тях събития предизвикват промени в онкогените и тумор-подтискащите гени, участват в причиняването на рак на хора и експериментални системи. В изследванията *in vivo* за хромозомни аберации може да възникне полиплоидия (включително ендоредупликация). Увеличаването на полиплоидията само по себе си обаче не е показание за анеугенен потенциал и може просто да показва смущение на клетъчния цикъл или цитотоксичност. Това изпитване не е предназначено да измерва анеуплоидия. Изпитването *in vivo* за микроядра в еритроцити на бозайници (глава Б.12 от настоящото приложение) и изпитването *in vitro* за микроядра на клетки от бозайници (глава Б.49 от настоящото приложение) са съответните препоръчителни изпитвания *in vivo* и *in vitro* за откриване на анеуплоидия.

Определенията на използваните термини са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

В настоящия тест се използват обикновено гризачи, но в някои случаи може да е подходящо използването други видове, ако това е научно обосновано. Прицелната тъкан в настоящото изпитване е костният мозък, тъй като последният представлява високо васкуларизирана тъкан и съдържа популация клетки с бърз цикъл, които могат лесно да се изолират и обработят. Научната обосновка за използване на видове, различни от плъхове и мишки, следва да бъде предоставена в протокола. Ако се използват видове, различни от гризачи, препоръчва се измерването на хромозомни аберации в костния мозък да се интегрира в друго подходящо изпитване за токсичност.

Ако има доказателства, че изпитваният химикал (или химикали) или негов метаболит (или метаболити) няма да достигне до прицелната тъкан, може да не е подходящо да се използва настоящото изпитване.

Преди използването на метода за изпитване по отношение на смес с цел генериране на данни за планирана регулаторна цел, следва да се разгледа въпросът дали той може да даде адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо. Такива съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа.

▼ **M7****ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ**

Животните се експонират на изпитвания химикал по подходящ път и се умъртвяват по хуманен начин в подходящ момент след третирането. Преди умъртвяването животните се третират с блокиращ метафазата агент (напр. колхицин или колцемид). След това се приготвят и оцветяват хромозомни препарати от клетките от костен мозък и клетките в метафаза се анализират за хромозомни аберации.

ПРОВЕРКА НА ПРИГОДНОСТТА НА ЛАБОРАТОРИЯТА**Проучване на пригодността**

За да се установи дали е наличен достатъчно опит за провеждане на изследването преди той да бъде използван за рутинно изпитване, лабораторията следва да е доказала капацитет за възпроизвеждане на очаквани резултати от публикувани данни (напр. (6)) за честота на хромозомни аберации с минимум два химикала за положителни контроли (включително слаб отклик, предизвикан от ниски дози в положителни контроли), като например посочените в таблица 1, и със съвместими контроли на носител/разтворител (вж. точка 22). При тези опити следва да се използват дози, които дават възпроизводими и свързани с дозата увеличения, а опитите следва да доказват чувствителността и динамичния обхват на системата за изпитване в представляващата интерес тъкан (костен мозък), чрез използване на метода за преброяване, който ще се прилага в лабораторията. Това изискване не се прилага за лаборатории, които разполагат с опит, т.е. които разполагат с данни за предходни периоди, както е определено в точки 10—14.

Данни за контролите за предходни периоди

В хода на проучванията за пригодност лабораторията следва да установи:

- размах и разпределение при положителните контроли от предходни периоди, и
- размах и разпределение при отрицателните контроли от предходни периоди.

При първото придобиване на данни за разпределението при отрицателните контроли от предходни периоди паралелните отрицателни контроли следва да бъдат съобразени с публикуваните данни за контролите, когато такива са налице. При добавяне на повече опитни данни към разпределението за предходни периоди при контролите паралелните отрицателни контроли следва в идеалния случай да бъдат в рамките на граници за контрол 95 % на това разпределение. Базата данни на дадената лаборатория за отрицателните контроли за предходни периоди следва да е статистически устойчива, за да се гарантира способността на лабораторията за оценка на разпределението на нейните данни за отрицателните контроли. В литература се посочва, че може да са необходими най-малко 10 опита, но е за предпочитане провеждането на минимум 20 опита при сравними условия на опитите. Лабораториите трябва да използват методи за контрол на качеството, като например контролни карти (напр. С-карти или карти за средна стойност (\bar{X} -bar) (7)), за определяне на варирането на данните им, и за доказване, че методологията е „под контрол“ в техните лаборатории. В литературата (8) могат да се намерят допълнителни препоръки относно начина на създаване и използване на данни от предходни периоди (т.е. критерии за включване и изключване на данни в данните за предходни периоди и критериите за приемливост за даден опит).

В случай, че дадена лаборатория не е извършила достатъчен брой опити за установяване на статистически устойчиво разпределение при отрицателните контроли (вж. точка 11) по време на проучванията за пригодност (описани в точка 9), приемливо е разпределението да бъде установено по време на първите рутинни изпитвания. При този подход следва да се прилагат препоръките, посочени в литературата (8), и резултатите от отрицателните контроли, получени при тези опити, следва да продължат да са в съответствие с публикуваните данни за отрицателните контроли.

▼ **M7**

Всички промени в опитния протокол следва да бъдат разглеждани от гледна точка на тяхното отражение върху съгласуваността на произтичащите данни със съществуващите бази данни за контролите на дадената лаборатория за предходни периоди. Само значителни несъответствия следва да водят до създаването на нова база данни за контролите за предходни периоди, в случай че с експертна оценка се установи, че тя се различава от предходното разпределение (вж. точка 11). По време на повторното създаване може да не е необходима пълна база данни за отрицателните контроли за позволяване на провеждането на действителни изпитвания, при условие че лабораторията може да докаже, че стойностите на нейните паралелни отрицателни контроли остават в съответствие или с предишната им база данни, или със съответните публикувани данни.

Данните за отрицателните контроли следва да се състоят от срещането на структурни хромозомни аберации (изключвайки празнини) във всяко животно. Паралелните отрицателни контроли в идеалния случай следва да бъдат в рамките на граници за контрол 95 % от разпределението от базата данни на дадената лаборатория за отрицателните контроли за предходни периоди. Когато данните за паралелните отрицателни контроли попадат извън 95 %-ните граници за контрол, те могат да бъдат приемливи за включване в разпределението при контролите от предходни периоди, при условие че тези данни не са екстремални стойности, силно различаващи се от нормалните, и има доказателства, че системата за изпитване е „под контрол“ (вж. точка 11), както и липсват доказателства за техническа или човешка грешка.

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

Следва да се използват обичайно използвани в лабораториите породи от здрави млади полово зрели животни. Обичайно се използват плъхове, въпреки че мишките може също да са подходящи. Всеки друг подходящ вид бозайници може да се използват, ако е предоставена научна обосновка в протокола.

Условия на отглеждане и хранене на животните

За гризачи в помещението, в което се намират животните, температурата следва да е 22 °C (± 3 °C). Въпреки че в идеалния случай относителната влажност следва да бъде 50—60 %, тя трябва да е поне 40 % и за предпочитане да не превишава 70 %, освен по време на почистване на помещението. 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 този път. Гризачите трябва да бъдат разпределени в малки групи (не повече от пет в клетка) от един и същ пол и третирана група, ако не се очаква агресивно поведение, за предпочитане в клетки с твърд под, с подходящо облагородяване на жизнената среда. Животните могат да се настаняват отделно само ако това е научно обосновано.

Подготовка на опитните животни

Обикновено се използват здрави, млади полово зрели животни (за гризачи в идеалния случай на възраст 6—10 седмици в началото на третирането, макар че малко по-възрастни животни също са приемливи), които се разпределят на случаен принцип в контролни групи и групи за третиране. Отделните животни се идентифицират индивидуално единствено чрез хумани, минимално инвазивни методи (напр. чрез поставяне на пръстен, поставяне на марка, микрочип или биометрична идентификация, но не и чрез изрязване на уши или пръсти) и се аклиматизират към лабораторните условия поне пет дни. Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. Кръстосаното замърсяване с положителната контрола и с изпитвания химикал следва да се избягва. В началото на изследването вариациите в теллото на животните следва да са минимални и да не превишават ± 20 % от средното телло на всеки пол.

Приготвяне на дозите

Твърдите изпитвани химикали следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители, или да се смесят в хранителния

▼ **M7**

режим или в питейната вода преди дозирането на животните. Течните изпитвани химикали могат да се дозират директно или да се разреждат преди дозиране. При експозиция чрез инхалация изпитваните химикали могат да се прилагат като газ, пари или аерозол с твърда/течна фаза, в зависимост от техните физични и химични свойства. Следва да се използват пресни смеси на изпитвания химикал, освен ако данните за стабилността показват, че е допустимо съхранение и посочват подходящите условия за съхранение.

Разтворител/носител

Разтворителят/носител не следва да има токсични ефекти при използваните нива на доза, а също така не следва да има съмнения за възможна химическа реакция с изпитваните химикали. Ако се използват други освен добре познатите разтворители/носители, включването им следва да се подкрепи от референтни данни за съвместимостта им. Препоръчва се винаги, когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на вода като разтворител/носител. Примери за обичайно използвани съвместими разтворители/носители са водата, физиологичният разтвор, разтворът на метилцелулоза, разтворът на натриевата сол на карбоксиметилцелулозата, маслиновото масло и царевичното масло. При липсата на предходни или публикувани данни за контроли, показващи, че избрания нетипичен разтворител/носител не предизвиква структурни аберации или други неблагоприятни ефекти, следва да се проведе първоначално изследване, за да се установи допустимостта на контролата на разтворител/носител.

Контроли*Положителни контроли*

Във всяко изпитване обикновено следва да бъде включена група от животни, третирани с химикал за положителна контрола. Това може да се отмени, ако изпитващата лаборатория е доказала пригодността си за провеждане на изпитването и е установила размах при положителните контроли от предходни периоди. Когато не е включена паралелна положителна контролна група, във всеки опит следва да се включат контроли на преброяването (фиксиран и неоцветен предметни стъкла). Те могат да бъдат получени като в преброяването на проучването се включат подходящи референтни проби, които са били получени и съхранявани при отделен опит с положителни контроли, провеждан периодично (например на всеки 6—18 месеца) в лабораторията, в която се провежда изпитването; например, по време на изпитвания за пригодност и редовно след това, когато това е необходимо.

Химикалите за положителни контроли следва по надежден начин да предизвикват откриваемо увеличение в честотата на клетките със структурни хромозомни аберации в рамките над спонтанното равнище. Дозите за положителните контроли следва да са така избрани, че ефектите да са ясни, но да не разкриват непосредствено на преброявания идентичността на кодирани проби. Приемливо е положителните контроли да се прилагат по път, различен от този за изпитвания химикал, чрез използване на различен график за третиране, и извършването на пробовземането да е само в точно определена времева точка. Освен това за положителна контрола може да се разгледа използването на химикали, принадлежащи към свързан химичен клас, когато е подходящо. Примери за химикали за положителни контроли са включени в таблица 1.

Таблица 1.

Примери за химикали за положителни контроли

Химикал	CASRN
Етилов метансулфонат	62-50-0
Метилов метансулфонат	66-27-3
Етилниитрозоуреа	759-73-9
Митомидин С	50-07-7
Циклофосфамид (монохидрат)	50-18-0 (6055-19-2)
Триетиленмеламин	51-18-3

▼ **M7***Отрицателни контроли*

При всяко време на вземане на проби следва да бъде включена отрицателна контролна група животни, която следва да бъде третирана по същия начин както третираните групи, с изключение на това, че не се третира с изпитвания химикал. Ако за прилагане на изпитвания химикал се използва разтворител/носител, контролната група трябва да получава този разтворител/носител. Ако обаче с данни за отрицателните контроли от предходни периоди са доказани последователно вариране между животните и честоти на клетките със структурни хромозомни аберации по всяко време на пробовземане за изпитващата лаборатория, може да е необходимо само едно единствено пробовземане за отрицателната контрола. Когато се използва едно единствено пробовземане за отрицателни контроли, това следва да бъде първото време на вземане на проба за изследването.

ПРОЦЕДУРА**Брой и пол на животните**

Като цяло откликът с микроядра е сходен при мъжките и женските животни (9) и се очаква, че това ще важи също така за структурните хромозомни аберации; поради това повечето изследвания могат да бъдат извършени в рамките на който и да е от двата пола. Данни, показващи относими разлики между мъжките и женските (например разлики в общата токсичност, метаболизма, бионаличността, токсичността за костния мозък и т.н., включително например изследване за определяне на обхвата), биха насърчили използването на двата пола. В този случай може да е уместно да се извърши проучване с двата пола, например като част от изследване за токсичност с повтарящи се дози. Ако се използват и двата пола, може да е уместно да се приложи факторен дизайн. Подробна информация как да се анализират данните с използването на посочения дизайн е дадена в допълнение 2.

Числеността на групите при започване на изследването следва да бъде определена с оглед предоставяне на минимум 5 анализируеми животни от група от един пол, или от всеки пол, ако са използвани и двата пола. Когато експозицията на хора на химикали може да е специфична в зависимост от пола, като например при някои фармацевтични продукти, изпитването следва да се проведе с животни от подходящия пол. Като насока за типичните максимални изисквания за животни, едно проучване за костен мозък с две времена на пробовземане, три групи на определена доза и една паралелна отрицателна контролна група, плюс положителна контролна група (всяка група е съставена от пет животни от един и същ пол), ще изисква 45 животни.

Нива на доза

Ако се извършва предварително изследване за определяне на обхвата, поради това че към съответния момент няма подходящи данни, които да подпомогнат избора на доза, то следва да се извърши в същата лаборатория, като се използва същият вид, порода, пол и режим на третиране, който се използва и в главното изследване (10). С проучването следва да се направи опит да се установи максималната допустима доза (МДД), определена като най-високата доза, която ще се толерира без доказателства за ограничаваша изследването токсичност спрямо продължителността на периода на изследването (например чрез потискане на телесното тегло или цитотоксичност за хемопоетичната система), но без смърт или доказателства за болка, страдание или дистрес, които изискват умъртвяване по хуманен начин (11).

Най-високата доза може също да се определи и като доза, която предизвиква известни признаци на токсичност за костния мозък.

Химикалите, които показват насищане по отношение на токсикокинетични свойства, или предизвикват процеси на детоксикация, които могат да доведат до намаляване на експозицията след дългосрочно третиране, могат да представляват изключения от критериите за определяне на дозата и следва да се оценяват за всеки отделен случай.

С цел получаване на информация за дозата и отклика дадено пълно проучване следва да включва отрицателна контролна група и най-малко три нива на доза, обикновено разделени с кратност 2, но не по-голяма от 4. Ако изпитваният химикал не предизвиква токсичност в изследването за

▼ **M7**

определяне на обхвата или въз основа на съществуващите данни, най-високата доза за отделно прилагане следва да бъде 2 000 mg/kg телесно тегло. Ако обаче изпитваният химикал предизвиква токсичност, МДД следва да бъде най-високата приложена доза и използваните нива на доза следва да са в обхват от максималната доза до доза, която, предизвиква слаба токсичност или не е токсична. Когато токсичност за прицелната тъкан (костен мозък) се наблюдава при всички изпитвани нива на доза, препоръчително е допълнително проучване при нетоксични дози. За проучванията, целящи по-подробно характеризиране на количествената информация за доза-отклик, може да се изискват допълнителни групи на определена доза. За някои типове изпитвани химикали (напр. фармацевтични продукти за хуманна употреба), обхванати от специфични изисквания, тези граници могат да варират.

Гранично изпитване

Ако опити за определяне на обхвата на дозите, или съществуващи данни от свързани породи животни, посочват, че режим на третиране най-малко при пределна доза (описан по-долу) не предизвиква видими токсични ефекти (включително липса на потискане на пролиферацията на костния мозък или на други доказателства за цитотоксичност за прицелната тъкан), и ако не може да се очаква генотоксичност на базата на проучвания *in vitro* за генотоксичност или данни от структурно подобни химикали, то тогава пълно изследване с три нива на доза може да не се смята за необходимо, при условие, че е доказано, че изпитваният химикал (или химикали) достига до прицелната тъкан (костен мозък). В такива случаи едно ниво на доза при пределната доза може да бъде достатъчно. За период на прилагане от >14 дни пределната доза е 1 000 mg/kg телесно тегло/ден. За период на прилагане от 14 дни или по-малко пределната доза е 2 000 mg/kg телесно тегло/ден.

Прилагане на дозите

При планирането на изследването следва да бъде взет предвид очакваният път на експозиция на човека. Поради това като обосновани могат да бъдат избрани например пътища на експозиция като хранителен режим, питейна вода, локално, подкожно, орално (през сонда), чрез вдишване, интратрахеално или имплантация. Във всички случаи пътят следва да се избере така, че да осигури достатъчна експозиция на прицелната тъкан (или тъкани). Интраперитонеалното инжектиране обикновено не се препоръчва, тъй като то не е очакван път на експозиция на човека, и следва да бъде използвано само със специална научна обосновка. Ако изпитваният химикал се смеси в хранителния режим или в питейната вода, по-специално в случай на еднократно дозиране, следва да се положи грижа закъснението между консумацията на храна и вода и пробовземането да е достатъчно, за да позволи откриването на ефектите (вж. точки 33—34). Максималният обем течност, който може да се приложи еднократно със сонда или инжекция, зависи от големината на изпитваното животно. Обемът обичайно 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. Обеми, по-високи от този, следва да се обосноват. С изключение на дразнещи или корозивни изпитвани химикали, които обикновено предизвикват изострени ефекти при по-високи концентрации, варирането в изпитвания обем трябва да бъде сведено до минимум чрез регулиране на концентрацията с оглед осигуряване на прилагането на постоянен обем спрямо телесното тегло при всички нива на доза.

График на третиране

Изпитваните химикали обичайно се прилагат като еднократно третиране, но могат също да се прилагат като разделена доза (т.е. две или повече третиране в един и същи ден, разделени от не повече от 2—3 часа), за да се улесни прилагането на голям обем. При тези обстоятелства или при прилагане на изпитвания химикал чрез вдишване, графикът за пробовземане трябва да се определи въз основа на времето на последното прилагане на доза или края на експозицията.

Налице са малко данни относно пригодността на протокол с повтаряща се доза за това изпитване. Независимо от това, в случаите, когато е желателно това изпитване да бъде интегрирано в изпитване за токсичност с повтаряща

▼ M7

се доза, следва да се вземат мерки за избягване на загубите на митотични клетки с хромозомни увреждания, което може да се случи при токсични дози. Такова интегриране е приемливо, когато най-високата доза е по-голяма или равна на пределната доза (вж. точка 29) и към група на определена доза е приложена пределната доза за продължителността на периода на третиране. Изпитването за микроядра (метод за изпитване Б.12) следва да се разглежда като предпочитаното изпитване *in vivo* за хромозомни аберации, когато се желае интегриране с други проучвания.

Пробите от костен мозък следва да се вземат в два отделни момента след еднократни третираня. За гризачи първият интервал на пробовземане следва да бъде времето, необходимо за завършване на 1,5 пъти нормалната продължителност на клетъчния цикъл (който нормално е 12—18 часа след периода на третиране). Тъй като времето за поемането и метаболизирането на изпитвания химикал (или химикали), както и ефектът му върху кинетиката на клетъчния цикъл, могат да повлияят върху оптималното време за откриване на хромозомни аберации, препоръчва се вземане на по-късна проба — 24 часа след вземането на първата проба. При първото вземане на проба следва да бъдат третирани всички групи на определена доза и да бъдат взети проби за анализ; независимо от това, при пробовземане на по-късен етап (или етапи) е необходимо да се прилага само най-високата доза. Ако въз основа на научна обосновка се използват режими на дозиране на повече от един ден, обичайно следва да се използва едно време на пробовземане до около 1,5 пъти от нормалната продължителност на клетъчния цикъл след окончателното третиране.

След третирането и преди вземането на пробата, животните се инжектират интраперитонеално с подходяща доза на блокиращ метафазата агент (напр. колцемид или колхицин) и пробовземането се извършва след подходящ интервал от време. За мишки този интервал е приблизително 3-5 часа преди пробовземането, а за плъхове той е 2-5 часа. Клетките се събират от костния мозък и след набухване, фиксиране и оцветяване се анализират за хромозомни аберации (12).

Наблюдения

Общи клинични наблюдения върху изпитваните животни следва да бъдат извършвани поне един път дневно и клиничните признаци следва да бъдат записвани, за предпочитане по едно и също време (или времена) веднъж дневно и като се има предвид пиковият период за поява на очакваните ефекти след дозиране. По време на периода на дозиране всички животни следва да се наблюдават за заболяемост и смъртност поне два пъти дневно. Теглото на всички животни следва да се измерва в началото на изследването, поне един път в седмицата по време на изследвания с повтаряща се доза, и при умъртвяването. При изследвания с продължителност най-малко една седмица консумацията на храна се измерва най-малко един път седмично. Ако изпитваният химикал се прилага чрез водата за пиене, консумацията на вода следва да се измерва при всяка смяна на водата и най-малко един път в седмицата. Животните, проявяващи нелетални признаци на прекомерна токсичност, следва да се умъртвят по хуманен начин преди приключването на периода на изпитване (11).

Експозиция на прицелна тъкан

В подходящо време (или времена) следва да се взема кръвна проба, за да се позволи изследване на плазмените нива на изпитваните химикали с цел доказване на експозиция на костен мозък, там където е обосновано и когато не са налични други данни за експозиция (вж. точка 44).

Костен мозък и хромозомни препарати

Непосредствено след умъртвяването по хуманен начин клетките от костния мозък се вземат от бедрената кост или големия пищял на животните, експонират се на хипотоничен разтвор и се фиксират. След това клетките в метафаза се разнасят по предметни стъкла и се оцветяват по установени методи (вж. (3) (12)).

▼ **M7****Анализ**

Всички предметни стъкла, включително тези на положителните и отрицателните контроли, следва да се кодират независимо едно от друго преди анализа и следва да се разбъркат на случаен принцип, така че преброяващият да не е запознат с условията на третирането.

Митотичният индекс следва да се определи като мярка на цитотоксичност в най-малко 1 000 клетки на едно животно за всички третирани животни (включително и положителните контроли), нетретирани животни и животни, които са отрицателни контроли на носител/разтворител.

Следва да се анализират минимум 200 метафази от всяко животно за структурни хромозомни аберации със и без празнини (6). Независимо от това, ако базата данни за отрицателните контроли за предходни периоди показва, че средната фоновата честота на структурните хромозомни аберации е < 1 % в лабораторията, провеждаща изпитването, трябва да се обърне внимание на преброяването на допълнителни клетки. Хроматидният и хромозомният тип аберации следва да се отчитат поотделно и да се класифицират по подтипове (разкъсвания, обмени). Процедурите, използвани в лабораториите, следва да гарантират, че анализът на хромозомните аберации се извършва от добре обучени преброители и че му е направена партньорска оценка, ако е подходящо. Като признават, че процедурите по подготовка на предметно стъкло често водят до разкъсване на част от метафазите с произтичаща загуба на хромозоми, преброените клетки трябва следователно да съдържат брой центромери, не по-малък от $2n \pm 2$, където n е хаплоидният брой хромозоми за дадения вид.

ДАНИИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Обработка на резултатите**

Индивидуалните данни за животните следва да се представят в таблица. За всяко животно следва да се оценят митотичният индекс, броят на преброените клетки в метафаза, броят на аберациите на клетка в метафаза и процентът на клетките със структурна хромозомна аберация (или аберации). Различните типове структурни хромозомни аберации следва да се изброяват със своя брой и честотата за третираниите и контролните групи. Празнините, както и полиплоидните клетки и клетките с ендоредуплицирани хромозоми се записват отделно. Честотата на празнините се протоколира, но обичайно не се включва в анализа на общата честота на структурните аберации. Ако няма доказателства за разлика в отклика при различните полове, данните могат да се обединят за статистическия анализ. Данните за токсичност за животните и за клиничните признаци следва също да бъдат протоколирани.

Критерии за приемливост

Следните критерии определят приемливостта на изпитването:

- а) Данните за паралелната отрицателна контрола се считат за приемливи за допълване към базата данни на дадената лаборатория за контролите за предходни периоди (вж. точки 11—14);
- б) Паралелните положителни контроли или контролите на преброяването трябва да предизвикват отклици, които са съвместими с генерираните в базата данни за положителните контроли за предходни периоди, и да генерират статистически значимо увеличение в сравнение с отрицателна контрола (вж. точки 20—21);
- в) Анализирани са подходящ брой дози и клетки;
- г) Критериите за избор на най-високата доза са съвместими с описаните в точки 25—28.

Оценяване и тълкуване на резултатите

При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно положителен:

▼ M7

- а) в най-малко една от третираните групи се наблюдава статистически значимо увеличение на честотата на клетките със структурни хромозомни аберации (без празнини) в сравнение с паралелната отрицателна контрола,
- б) това увеличение е свързано с дозата поне за едно време на пробовземане при оценка, извършена с подходящ трендов тест, и
- в) някой от тези резултати е извън разпределението на данните за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. на основата на разпределение на Поасон с граници за контрол 95 %).

Ако в даден момент на пробовземане е разгледана само най-високата доза, изпитваният химикал се счита за ясно положителен, ако се наблюдава статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола и резултатите са извън разпределението на данните за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. на основата на разпределение на Поасон с граници за контрол 95 %). Препоръки за подходящи статистически методи могат да се намерят в литературата (13). При провеждане на анализ доза-отклик трябва да бъдат анализирани най-малко три третиранни с определена доза групи. При статистическите тестове за опитна единица следва да се използва отделното животно. Положителните резултати от изпитването за хромозомни аберации показват, че изпитваният химикал предизвиква структурни хромозомни аберации в костния мозък на изпитвания животински вид.

При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно отрицателен, ако във всички изследвани опитни условия:

- а) в никоя от третираните групи не се наблюдава статистически значимо увеличение на честотата на клетките със структурни хромозомни аберации (без празнини) в сравнение с паралелната отрицателна контрола,
- б) в никое от времената на пробовземане няма свързано с дозата увеличение при оценка, извършена с подходящ трендов тест,
- в) всички резултати са в рамките на разпределението на данните за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. на основата на разпределение на Поасон с граници за контрол 95 %), и
- г) е наблюдавана експозиция на костен мозък на изпитвания химикал (или химикали).

Препоръки за най-подходящите статистически методи могат да се намерят в литературата (13). Доказателствата за експозиция на костния мозък на изпитван химикал могат да включват намаляване на митотичния индекс или измервания на нивата на изпитвания химикал (химикали) в плазмата или в кръвта. При интравенозно приложение доказателства за експозиция не са необходими. Като алтернатива, за да се докаже експозицията на костния мозък, могат да се използват данни за абсорбция — разпределение — метаболизъм — екскреция (АРМЕ), получени при провеждането на независимо проучване, с използване на същия път за прилагане и същия животински вид. Отрицателните резултати показват, че при условията за провеждане на изпитването изпитваният химикал не предизвиква хромозомни аберации в костния мозък на изпитвания вид.

Няма изискване за потвърждаване на ясно положителен или ясно отрицателен отклик.

В случаите, когато откликът не е ясно отрицателен или положителен и за да се подпомогне установяването на биологичната относимост на даден резултат (например при увеличение, което е слабо или с гранична стойност), данните следва да се оценят чрез експертна оценка и/или допълнителни изследвания от съществуващите приключени опити. В някои случаи би могло да се окаже полезно анализирането на повече клетки или извършването на опит с повторение, като се използват модифицирани опитни условия.

▼ **M7**

В редки случаи дори след допълнителни изследвания данните не позволяват стигането до заключение, че изпитваният химикал предизвиква положителни или отрицателни резултати, и следователно за изследването се заключава, че е неясно.

Честотите на полиплоидните и ендоредуплицираните метафази сред общия брой метафази следва да се регистрират поотделно. Едно увеличение в броя на полиплоидните/ендоредуплицираните клетки може да показва, че изпитваният химикал има потенциал да инхибира митотичните процеси или клетъчния цикъл (вж. точка 3).

Протокол от изпитването

Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

*Обобщение**Изпитван химикал:*

- източник, номер на партидата, крайна дата за употреба, ако има такава;
- стабилност на изпитвания химикал, ако е известна.

Вещество с една съставка:

- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- химична идентификация, като наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, SMILES или InChI код, структурна формула, чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и др.

Вещество, включващо повече съставки, UVCB и смеси:

- характеризирани, доколкото е възможно, от химическата идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Приготвяне на химикала за изпитване:

- обосновка за избора на носител;
- разтворимост и стабилност на изпитвания химикал в разтворител/носител, ако са известни;
- приготвяне на формулировките за хранителен режим, питейна вода или инхалация;
- аналитични определяния, свързани с формулировките (напр. устойчивост, хомогенност, номинални концентрации), когато се извършват такива;

Изпитвани животни:

- използван вид/порода и обосновка за избора;
- брой, възраст и пол на животните;
- източник за доставка на животните, условия на отглеждане, диета и т.н.;
- метод за еднозначно идентифициране на животните;
- за краткосрочни изследвания: индивидуално тегло на животните в началото и в края на изпитването; за изследвания, по-дълги от една седмица: индивидуално телесно тегло по време на изследването и консумация на храна. следва да бъдат включени размахът, средната стойност и стандартното отклонение на телесното тегло за всяка група.

▼ M7*Условия на изпитването:*

- положителни и отрицателни (на носител/разтворител) контроли;
- данни от изследването за установяване на обхвата, ако е проведено;
- обосновка за избора на нивото на доза;
- подробна информация за приготвянето на изпитвания химикал;
- подробна информация относно прилагането на изпитвания химикал;
- обосновка на пътя и продължителността на прилагането;
- методи за проверка дали изпитваният химикал (химикали) е достигнал до общото кръвообращение или до костния мозък;
- действителна доза (mg/kg телесно тегло дневно), изчислена от концентрацията на изпитвания химикал в хранителния режим/питейната вода (ppm), и консумация, ако е приложимо;
- подробности относно качество на храната и водата;
- метод за умъртвяване;
- метод за аналгезия (когато е използван);
- подробно описание на графици на третиране и вземане на проби и обосновки за направения избор;
- методи на приготвяне на предметни стъкла;
- методи за измерване на токсичността;
- идентичност на блокиращия метафазата химикал, неговата концентрация, доза и време на прилагане преди пробовземането;
- процедури за изолиране и съхраняване на проби;
- критерии за преброяване на аберациите;
- брой на анализирани клетки в метафаза на животно и брой на клетките, анализирани за определяне на митотичния индекс;
- критерии за приемливост на изпитването;
- критерии за считане на изследванията за положителни, отрицателни или недостатъчни за формулиране на заключение.

Резултати:

- състояние на животните преди и през целия период на изпитване, включително признаци на токсичност;
- митотичен индекс, посочен отделно за всяко животно;
- тип и брой аберации и аберантни клетки, посочен поотделно за всяко животно;
- общ брой на аберациите на група, със средни стойности и стандартни отклонения;
- брой клетки с аберации на група, със средни стойности и стандартни отклонения;
- Изменения в пloidията, ако се наблюдават, включително честоти на полиплоидни и/или ендоредуплицирани клетки;

▼ M7

- взаимоотношение доза-отклик, където е възможно;
- статистически анализи и използвани методи;
- данни, доказващи експозицията на костния мозък;
- данни за паралелни отрицателни и положителни контроли с размах, средни стойности и стандартни отклонения;
- данни за отрицателни и положителни контроли за предходни периоди, с размах, средни стойности и стандартни отклонения, и 95 % граници за контрол за разпределението, както и обхванат времеви период и брой на наблюденията;
- спазени критерии за положителен или отрицателен отклик.

Обсъждане на резултатите.

Заклучение.

Позовавания.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Adler, I.D. (1984), „Cytogenetic Tests in Mammals“, in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.
- (3) Preston, R.J. *et al.* (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, pp. 157-165.
- (4) Richold, M. *et al.* (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays“, in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.
- (5) Tice, R.R. *et al.* (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, pp. 305-312.
- (6) Adler, I.D. *et al.* (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, pp. 19-30.
- (7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (8) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (9) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.
- (10) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼M7

- (11) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.
- (12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1044, pp. 147-163.
- (13) Lovell, D.P. *et al.* (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays“, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

▼ M7*Допълнение 1*

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Анеуплоидия: всяко отклонение от обичайния диплоиден (или хаплоиден) брой на хромозомите с една или повече от една хромозома, но не и с кратни на цял набор (или набори) от хромозоми (вж. полиплоидия).

Центромера: област (области) от хромозомата, с която нишки от делителното вретено се свързват по време на клетъчното делене, като така позволяват методично придвижване на дъщерните хромозоми към полюсите на дъщерните клетки.

Химикал: вещество или смес.

Хроматиден тип аберация: структурно увреждане на хромозомата, изразяващо се в разкъсване на единични хроматиди или разкъсване и повторно съединяване между хроматиди.

Хромозомен тип аберация: структурно увреждане на хромозомата, изразяващо се в разкъсване или разкъсване и повторно съединяване на двете хроматиди на идентично място.

Ендоредупликация: процес, при които след S-период на удвояване на ДНК ядрото не навлиза в митоза, а започва друг S-период. Резултатът е хромозоми с 4, 8, 16, ... хроматиди.

Празнина: ахроматично увреждане, по-малко от ширината на една хроматидида, с минимална несъосност на хроматидите.

Митотичен индекс: отношението на броя на клетките в митоза към общия брой на клетките в дадена популация, което е мярка за пролиферационния статус на тази клетъчна популация.

Бройна аберация: промяна в броя на хромозомите в сравнение с нормалния брой, характерен за използваните животни (анеуплоидия).

Полиплоидия: бройна хромозомна аберация, свързана с промяна в броя на целия набор от хромозоми, за разлика от промяна в броя на част от хромозомния набор (вж. анеуплоидия).

Структурна хромозомна аберация: промяна в хромозомната структура, която се открива при микроскопско изследване на етапа на метафаза на клетъчното делене, наблюдавана във вид на делеции и фрагменти, вътрехромозомни или междухромозомни преустройства.

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

▼ M7

Допълнение 2

ФАКТОРНИЯТ ДИЗАЙН ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА РАЗЛИКИ МЕЖДУ ПОЛОВЕТЕ ПРИ ИЗСЛЕДВАНЕ *IN VIVO* ЗА ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ**Факторният дизайн и неговият анализ**

При този дизайн се изпитват минимум 5 мъжки и 5 женски животни на всяко равнище на концентрация, в резултат от което в дизайна се използват най-малко 40 животни (20 мъжки и 20 женски животни, плюс относимите положителни контроли).

Дизайнът, който е един от по-простите видове факторен дизайн, е равностоеен на двуфакторния дисперсионен анализ, с пола и равнището на концентрация като главни ефекти. Данните могат да бъдат анализирани с помощта на множество стандартни статистически софтуерни пакети като например SPSS, SAS, STATA, Genstat, както и с използване на R.

Анализът разпределя варирането в набора от данни като вариране между половете, вариране между концентрациите и вариране, свързано с взаимодействието между половете и концентрациите. Всеки от компонентите се тества спрямо оценка на варирането между животните за повторения в рамките на групите животни от един и същ пол, които са на една и съща концентрация. Пълни подробности за използваната методика са на разположение в множество стандартни статистически учебници (вж. позоваванията) и в помощните текстове, предоставени със статистическите пакети.

Анализът продължава с проверка на компонента за взаимодействие пол x концентрация в ANOVA таблицата ⁽¹⁾. При липсата на значим компонент за взаимодействие комбиниранията стойности за половете или за равнищата на концентрация предоставят валидни статистически тестове между равнищата, въз основа на компонента за обединеното вътрешногрупово вариране на ANOVA.

Анализът продължава като се раздели оценката на варирането между концентрациите на контрасти, които дават възможност за тест за линейни и квадратични контрасти на откликите за равнищата на концентрация. Когато е налице значимо взаимодействие пол x концентрация, този компонент също може да се подраздели на контрасти за линейно x пол и квадратично x пол взаимодействие. Тези компоненти предоставят възможност за тестове дали концентрационните отклици са успоредни за двата пола, или има диференциален отклик между двата пола.

Оценката на обединеното вътрешногрупово вариране може да се използва за предоставяне на възможност за тестове за сравнения по двойки на разликата между средните стойности. Тези сравнения могат да се правят между средните стойности за двата пола и между средните стойности за различното равнище на концентрация, като за сравнения с равнищата за отрицателните контроли. В случаите, когато е налице значимо взаимодействие, могат да се направят сравнения между средните стойности за различни концентрации в рамките на даден пол, или между средните стойности за половете при една и съща концентрация.

Позовавания

Съществуват много статистически учебници, в които се разглеждат теорията, планирането, методологията, анализа и тълкуването на факторните дизайни, вариращи от най-простите двуфакторни анализи до по-сложните форми, използвани в методологията за планиране на опити. По-долу е представен неизчерпателен списък. Някои книги предоставят практически примери за сравними модели, в някои случаи с код за провеждането на анализите с използване на различни софтуерни пакети.

⁽¹⁾ Статистиците, които използват подход за моделиране, като например обобщени линейни модели (GLM), може да подхождат към анализа по различен, но сравним начин, но не получават непременно традиционната ANOVA таблица, която датира от алгоритмичните подходи за изчисляване на статистически данни, разработени в епохата преди появата на компютрите.

▼M7

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). *Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application*. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). *Experiments: Planning, Analysis and Optimization*. John Wiley & Sons Inc.

▼ M7**В.12. ИЗПИТВАНЕ ЗА МИКРОЯДРА В ЕРИТРОЦИТИ НА БОЗАЙНИЦИ****ВЪВЕДЕНИЕ**

Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на Насоки за изпитване на ОИСР 474 (2014). Той е част от поредица от методи за изпитване от областта на генетичната токсикология. Разработен е документ на ОИСР, съдържащ ясна информация относно изпитванията в областта на генетичната токсикология, и преглед на актуалните изменения на посочените Насоки (1).

Изпитването *in vivo* за микроядра при бозайници е от особена значимост за оценка на генотоксичността, тъй като, въпреки че могат да варират според животинския вид, факторите за метаболизма *in vivo*, фармакокинетиката и процесите на поправка на ДНК са активни и допринасят за отклика. Изследването *in vivo* също е от полза за по-нататъшното проучване на генотоксичността, установена чрез *in vitro* система.

Изпитването *in vivo* за микроядра при бозайници се използва за откриване на предизвикани от изпитвания химикали увреждания на хромозомите или митотичния апарат на еритробласти. С изпитването се прави оценка на образуването на микроядра в еритроцити, пробовзети от костен мозък или от периферни кръвни клетки на животни, обичайно гризачи.

Целта на изпитването за микроядра е да се идентифицират химикали, причиняващи цитогенно увреждане, което води до образуването на микроядра, съдържащи изоставачи хромозомни фрагменти или цели хромозоми.

Когато еритробласт в костен мозък се развие в незрял еритроцит (понякога наричан също полихроматичен еритроцит или ретикулоцит), главното ядро се екструдира; всяко образувано вече микроядро може да изостане в цитоплазмата. Онагледяването или откриването на микроядра се улеснява в тези клетки, тъй като те не съдържат главно ядро. Увеличаването на честотата на незрелите еритроцити с микроядра в третираните животни е показател за индуцирани структурни или бройни хромозомни аберации.

Новополучените еритроцити с микроядра се идентифицират и се определят количествено чрез оцветяване, последвано или от визуално преброяване с използване на микроскоп, или от автоматизиран анализ. Преброяването на достатъчен брой незрели еритроцити в периферната кръв или в костния мозък на полово зрели животни се улеснява значително чрез използване на автоматизирана платформа за преброяване. Подобни платформи са приемливи алтернативи на ръчната оценка (2). Сравнителни проучвания показват, че такива методи, при използване на подходящи еталони за калибриране, могат да предоставят по-добра междулабораторна и вътрешнолабораторна възпроизводимост и чувствителност от ръчното микроскопско броене (3) (4). Автоматизираните системи, които могат да измерят честотата на еритроцитите с микроядра, включват поточни цитометри (5), платформи за анализ на изображения (6) (7) и цитометри с лазерно сканиране (8), без да са ограничени до тези уреди.

Хромозомните фрагменти могат да бъдат разграничени от целите хромозоми с помощта на редица критерии, въпреки че това обикновено не се прави като част от изпитването. Това включва установяване на наличието или липсата на кинетохора или центромерна ДНК, които са характерни за интактните хромозоми. Липсата на кинетохора или центромерна ДНК показва, че микроядрото съдържа само хромозомни фрагменти, докато наличието показва хромозомна загуба.

Определенията на използваните термини са дадени в допълнение 1.

▼ **M7****ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ**

Прицелната тъкан за генетични увреждания в настоящото изпитване е костният мозък на млади полово зрели гризачи, тъй като еритроцитите се произвеждат в тази тъкан. Измерването на микроядрата в незрели еритроцити в периферна кръв е приемливо и при други видове бозайници, за които е доказана достатъчна чувствителност за откриване на химикали, причиняващи структурни или бройни хромозомни аберации в тези клетки (чрез предизвикване на образуването на микроядра в незрели еритроцити), и е предоставена научна обосновка. Честотата на незрели еритроцити с микроядра е главната крайна точка. Честотата на съдържащи микроядра зрели еритроцити в периферната кръв може също да се използва като крайна точка при видове без силна селективност на далака по отношение на клетки с микроядра и когато животните се третират непрекъснато в продължение на период, който надвишава жизнения цикъл на еритроцита в използвания вид (например 4 или повече седмици при мишки).

Ако има доказателства, че изпитваният химикал (или химикали) или негов метаболит (или метаболити) няма да достигне до прицелната тъкан, може да не е подходящо да се използва настоящото изпитване.

Преди използването на метода за изпитване по отношение на смес с цел генериране на данни за планирана регулаторна цел, следва да се разгледа въпросът дали той може да даде адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо. Такива съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Животните се експонират на въздействието на изпитвания химикал по подходящ път. Ако се използва костен мозък, животните се умъртвяват по хуманен начин в подходящ момент (или моменти) от време след третирането, костният мозък се извлича и препаратите се изготвят и оцветяват (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Когато се използва периферна кръв, кръвта се взема в подходящ момент (или моменти) от време след третирането и препаратите се изготвят и оцветяват (12) (16) (17) (18). Когато третирането се прилага остро, важно е да се изберат моменти от време за събиране на костен мозък или на кръв, в които може да бъде открита свързана с третирането индукция на незрели еритроцити с микроядра. В случай на вземане на проби от периферна кръв трябва също така да е изминало време, достатъчно за проявяването на тези събития в циркулиращата кръв. Препаратите се анализират за наличие на микроядра или чрез визуализиране с микроскоп, анализ на изображения, поточна цитометрия, или чрез цитометрия с лазерно сканиране.

ПРОВЕРКА НА ПРИГОДНОСТТА НА ЛАБОРАТОРИЯТА**Проучване на пригодността**

За да се установи дали е наличен достатъчно опит за провеждане на изследването преди да се използва за рутинно изпитване, лабораторията следва да е доказала капацитет за възпроизвеждане на очаквани резултати от публикувани данни (17) (19) (20) (21) (22) за честота на микроядрата с минимум два химикала за положителни контроли (включително слаб отклик, предизвикан от ниски дози в положителни контроли), като например посочените в таблица 1, и със съвместими контроли на носител/разтворител (вж. точка 26). При тези опити следва да се използват дози, които дават възпроизводими и свързани с дозата увеличения, а опитите следва да доказват чувствителността и динамичния обхват на системата за изпитване в представящата интерес тъкан (костен мозък или периферна кръв), чрез използване на метода за преброяване, който ще се прилага в лабораторията. Това изискване не се прилага за лаборатории, които разполагат с опит, т.е. които разполагат с налична база данни за предходни периоди, както е определено в точки 14—18.

Данни за контролите за предходни периоди

В хода на проучванията за пригодност лабораторията следва да установи:

— размах и разпределение при положителните контроли от предходни периоди, и

▼ **M7**

— размах и разпределение при отрицателните контроли от предходни периоди.

При първото придобиване на данни за разпределението при отрицателните контроли от предходни периоди паралелните отрицателни контроли следва да бъдат съобразени с публикуваните данни за контролите, когато такива са налице. При добавяне на повече опитни данни към разпределението за предходни периоди при контролите паралелните отрицателни контроли следва в идеалния случай да бъдат в рамките на граници за контрол 95 % на това разпределение. Базата данни на дадената лаборатория за отрицателните контроли за предходни периоди следва да е статистически устойчива, за да се гарантира способността на лабораторията за оценка на разпределението на нейните данни за отрицателните контроли. В литература се посочва, че може да са необходими най-малко 10 опита, но е за предпочитане провеждането на минимум 20 опита при сравними условия на опитите. Лабораториите трябва да използват методи за контрол на качеството, като например контролни карти (напр. С-карти или карти за средна стойност (\bar{X})) (23)), за определяне на варирането на данните им, и за доказване, че методологията е „под контрол“ в техните лаборатории. В литературата (24) могат да се намерят допълнителни препоръки относно начина на създаване и използване на данни от предходни периоди (т.е. критерии за включване и изключване на данни в данните за предходни периоди и критериите за приемливост за даден опит).

В случай, че дадена лаборатория не е извършила достатъчен брой опити за установяване на статистически устойчиво разпределение при отрицателните контроли (вж. точка 15) по време на проучванията за пригодност (описани в точка 13), приемливо е разпределението да бъде установено по време на първите рутинни изпитвания. При този подход следва да се прилагат препоръките, посочени в литературата (24), и резултатите от отрицателните контроли, получени при тези опити, следва да продължат да са в съответствие с публикуваните данни за отрицателните контроли.

Всички промени в опитния протокол следва да бъдат разглеждани от гледна точка на тяхното отражение върху съгласуваността на произтичащите данни със съществуващите бази данни за контролите на дадената лаборатория за предходни периоди. Само значителни несъответствия следва да водят до създаването на нова база данни за контролите за предходни периоди, в случай че с експертна оценка се установи, че тя се различава от предходното разпределение (вж. точка 15). По време на повторното създаване може да не е необходима пълна база данни за отрицателните контроли за позволяване на провеждането на действителни изпитвания, при условие че лабораторията може да докаже, че стойностите на нейните паралелни отрицателни контроли остават в съответствие или с предишната им база данни, или със съответните публикувани данни.

Данните за отрицателните контроли следва да се състоят от срещането на незрели еритроцити с микроядра във всяко животно. Паралелните отрицателни контроли в идеалния случай следва да бъдат в рамките на граници за контрол 95 % от разпределението от базата данни на дадената лаборатория за отрицателните контроли за предходни периоди. Когато данните за паралелните отрицателни контроли попадат извън 95 %-ните граници за контрол, те могат да бъдат приемливи за включване в разпределението при контролите от предходни периоди, при условие че тези данни не са екстремални стойности, силно различаващи се от нормалните, и има доказателства, че системата за изпитване е „под контрол“ (вж. точка 15), както и липсват доказателства за техническа или човешка грешка.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Приготвяне

Избор на животински вид

Следва да се използват обичайно използвани в лабораториите породи от здрави млади полови зрели животни. Могат да се използват мишки, плъхове или други подходящи видове бозайници. Когато се използва периферна кръв, трябва да бъде установено, че отстраняването на клетки с микроядра от образци чрез далака не компрометира откриването на

▼ **M7**

индуцирани микроядра в избраните видове. За това съществуват категорични доказателства за периферна кръв от мишки и плъхове (2). Научната обосновка за използване на видове, различни от плъхове и мишки, следва да бъде предоставена в протокола. Ако се използват видове, различни от гризачи, препоръчва се измерването на индуцираните микроядра да се интегрира в друго подходящо изпитване за токсичност.

Условия на отглеждане и хранене на животните

За гризачи в помещението, в което се намират животните, температурата следва да е 22 °C (\pm 3 °C). Въпреки че в идеалния случай относителната влажност следва да бъде 50—60 %, тя трябва да е поне 40 % и за предпочитане да не превишава 70 %, освен по време на почистване на помещението. 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 този път. Гризачите трябва да бъдат разпределени в малки групи (не повече от пет в клетка) от един и същ пол и третирана група, ако не се очаква агресивно поведение, за предпочитане в клетки с твърд под, с подходящо облагородяване на жизнената среда. Животните могат да се настаняват отделно само ако това е научно обосновано.

Подготовка на опитните животни

Обикновено се използват здрави, млади полово зрели животни (за гризачи в идеалния случай на възраст 6—10 седмици в началото на третирането, макар че използването на малко по-възрастни животни също е приемливо), които се разпределят на случаен принцип в контролни групи и групи за третиране. Отделните животни се идентифицират индивидуално единствено чрез хуманни, минимално инвазивни методи (напр. чрез огръстеняване, поставяне на марка, микрочип или биометрична идентификация, но не и чрез изрязване на уши или пръсти) и се аклиматизират към лабораторните условия поне пет дни. Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. Кръстосаното замърсяване с положителната контрола и с изпитвания химикал следва да се избягва. В началото на изследването вариациите в теглото на животните следва да са минимални и да не превишават \pm 20 % от средното тегло на всеки пол.

Приготвяне на дозите

Твърдите изпитвани химикали следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители, или да се смесят в хранителния режим или в питейната вода преди дозирането на животните. Течните изпитвани химикали могат да се дозират директно или да се разреждат преди дозиране. При експозиция чрез инхалация изпитваните химикали могат да се прилагат като газ, пари или аерозол с твърда/течна фаза, в зависимост от техните физични и химични свойства. Следва да се използват пресни смеси на изпитвания химикал, освен ако данните за стабилността показват, че е допустимо съхранение и посочват подходящите условия за съхранение.

Условия на изпитване*Разтворител/носител*

Разтворителят/носителят не следва да има токсични ефекти при използваните нива на доза, а също така не следва да е възможна химическа реакция с изпитваните химикали. Ако се използват други освен добре познатите разтворители/носители, включването им следва да се подкрепи от референтни данни за съвместимостта им. Препоръчва се винаги, когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на вода като разтворител/носител. Примери за обичайно използвани съвместими разтворители/носители са водата, физиологичният разтвор, разтворът на метилцелулоза, разтворът на натриевата сол на карбоксиметилцелулозата, маслиновото масло и царевичното масло. При липсата на предходни или публикувани данни за контроли, показващи, че избраният нетипичен разтворител/носител не индуцира микроядра и не предизвиква други неблагоприятни ефекти, следва да се проведе първоначално изследване, за да се установи допустимостта на контролата на разтворител/носител.

▼ **M7****Контроли***Положителни контроли*

Във всяко изпитване обикновено следва да бъде включена група от животни, третирани с химикал за положителна контрола. Това може да се отмени, ако изпитващата лаборатория е доказала пригодността си за провеждане на изпитването и е установила размах при положителните контроли от предходни периоди. Когато не е включена паралелна положителна контролна група, във всеки опит следва да се включат контроли на преброяването (фиксиран и неоцветен предметни стъкла или проби от клетъчни суспензии, както е подходящо за метода за преброяване). Те могат да бъдат получени като в преброяването на проучването се включат подходящи референтни проби, които са били получени и съхранявани при отделен опит с положителни контроли, провеждан периодично (например на всеки 6—18 месеца); например, по време на изпитвания за пригодност и редовно след това, когато това е необходимо.

Химикалите за положителни контроли следва по надежден начин да предизвикват откриваемо увеличение в честотата на микроядрата над спонтанното равнище. Когато се използва ръчно преброяване с микроскоп, дозите за положителните контроли следва да са така избрани, че ефектите да са ясни, но да не разкриват непосредствено на преброяващия идентичността на кодираните проби. Приемливо е положителните контроли да се прилагат по път, различен от този за изпитвания химикал, чрез използване на различен график за третиране, и извършването на пробовземането да е само в точно определена времева точка. Освен това за положителна контрола може да се разгледа използването на химикали, принадлежащи към свързан химичен клас, когато е подходящо. Примери за химикали за положителни контроли са включени в таблица 1.

Таблица 1.

Примери за химикали за положителни контроли.

Химикали и CASRN
Етилов метансулфонат (CASRN 62-50-0]
Метилов метансулфонат (CASRN 66-27-3]
Етилниитрозоуреа (CASRN 759-73-9]
Митомидин С (CASRN 50-07-7]
Циклофосфамид (монохидрат) [CASRN 50-18-0 (CASRN 6055-19-2)]
Триетиленмеламин (CASRN 51-18-3]
Колхицин (CASRN 64-86-8] или винбластин (CASRN 865-21-4] — както анеугени

Отрицателни контроли

При всяко време на вземане на проби следва да бъде включена отрицателна контролна група животни, която следва да бъде третирана по същия начин както третираните групи, с изключение на това, че не се третира с изпитвания химикал. Ако за прилагане на изпитвания химикал се използва разтворител/носител, контролната група трябва да получава този разтворител/носител. Ако обаче с данни за отрицателните контроли от предходни периоди са доказани последователно вариране между животните и честоти на клетките с микроядра по всяко време на пробовземане за изпитващата лаборатория, може да е необходимо само едно единствено пробовземане за отрицателната контрола. Когато се използва едно единствено пробовземане за отрицателни контроли, това следва да бъде първото време на вземане на проба за изследването.

▼ M7

Ако се използва периферна кръв, вместо паралелна отрицателна контрола за краткосрочните проучвания е приемлива проба преди третирането, когато произтичащите данни са в съответствие с базата данни на изпитващата лаборатория за контроли за предходни периоди. Доказано е, че по отношение на плъхове пробовземането на малки обеми (напр. под 100 μ л/ден) преди третирането има минимално въздействие върху фоновата честота на микроядрата (25).

ПРОЦЕДУРА**Брой и пол на животните**

Като цяло, откликът чрез микроядра е сходен у мъжките и женските животни и следователно повечето изследвания могат да бъдат извършени с който и да е пол (26). Данни, показващи относими разлики между мъжките и женските (например разлики в общата токсичност, метаболизма, бионаличността, токсичността за костния мозък и т.н., включително например в изследване за определяне на обхвата), биха насърчили използването на двата пола. В този случай може да е уместно да се извърши проучване с двата пола, например като част от изследване за токсичност с повтарящи се дози. Ако се използват и двата пола може да е уместно да се приложи факторен дизайн. Подробна информация за това как да се анализират данните с използването на посочения дизайн са дадени в допълнение 2.

Числеността на групите при започване на изследването следва да бъде определена с оглед предоставяне на минимум 5 анализируеми животни от група от един пол, или от всеки пол, ако са използвани и двата пола. Когато експозицията на хора на химикали може да е специфична в зависимост от пола, като например при някои фармацевтични продукти, изпитването следва да се проведе с животни от подходящия пол. Като насока за типичните максимални изисквания за животни, едно проучване за костен мозък, проведено в съответствие с параметрите, установени в точка 37, с три групи на определена доза и паралелни отрицателни и положителни контролни групи (всяка група е съставена от пет животни от един и същ пол), ще изисква между 25 и 35 животни.

Нива на доза

Ако се извършва предварително изследване за определяне на обхвата, поради това че към момента няма подходящи данни, които да са налични като помощно средство при избора на доза, то следва да се извърши в същата лаборатория, като се използва същият вид, порода, пол и режим на третиране, който се използва и в главното изследване (27). С проучването следва да се направи опит да се установи максималната допустима доза (МДД), определена като най-високата доза, която ще се толерира без доказателства за ограничаваща изследването токсичност спрямо продължителността на периода на изследването (например чрез подтичане на телесното тегло или цитотоксичност за хемопоетичната система, но без смърт или доказателства за болка, страдание или дистрес, които изискват умъртвяване по хуманен начин (28)).

Най-високата доза може също да се дефинира като доза, която предизвиква токсичност в костния мозък (напр. намаляване на дела на незрелите еритроцити в общия брой еритроцити в костния мозък или в периферната кръв с повече от 50 %, но до минимум 20 % от контролната стойност). При анализ на CD71-положителни клетки в периферното кръвообращение (т.е. чрез поточна цитометрия) обаче, тази много млада част от незрелите еритроцити откликва на токсични предизвикателства по-бързо, отколкото по-голямата РНК-положителна кохорта от незрели еритроцити. Поради това при дизайните с остра експозиция, изследващи CD71-положителната фракция незрели еритроцити, може да се прояви по-висока стойност за видимата токсичност, в сравнение с дизайните, които идентифицират незрели еритроцити въз основа на съдържанието на РНК. По тази причина, когато опитите включват третиране от пет дни или по-малко, най-високото ниво на доза за изпитвани химикали, които причиняват токсичност, може да се дефинира като дозата, която предизвиква статистически значимо намаление в дела на CD71-положителни незрели еритроцити в общия брой еритроцити, но до минимум 5 % от контролната стойност (29).

▼ M7

Химикалите, които показват насищане по отношение на токсикокинетични свойства, или предизвикват процеси на детоксикация, които могат да доведат до намаляване на експозицията след дългосрочно прилагане, могат да представляват изключения от критериите за определяне на дозата и следва да се оценяват за всеки отделен случай.

С цел получаване на информация за дозата и отклика дадено пълно проучване следва да включва отрицателна контролна група и най-малко три нива на доза, обикновено разделени с кратност 2, но не по-голяма от 4. Ако изпитваният химикал не предизвиква токсичност в изследване за определяне на обхвата или въз основа на съществуващите данни, най-високата доза за период на прилагане от 14 дни или повече следва да бъде 1 000 mg/kg телесно тегло/ден, а за периоди на прилагане от по-малко от 14 дни — 2 000 mg/kg телесно тегло/ден. Ако обаче изпитваният химикал предизвиква токсичност, МДД следва да бъде най-високата приложена доза и използваните нива на доза следва да са в обхват от максималната доза до доза, която, предизвиква слаба токсичност или не е токсична. Когато токсичност за прицелната тъкан (костен мозък) се наблюдава при всички изпитвани нива на доза, препоръчително е допълнително проучване при нетоксични дози. За проучванията, целящи по-подробно характеризиране на количествената информация за доза-отклик, може да се очаква допълнителни групи на определена доза. За някои типове изпитвани химикали (напр. фармацевтични продукти за хуманна употреба), обхванати от специфични изисквания, тези граници могат да варират.

Гранично изпитване

Ако опити за определяне на обхвата на дозите или съществуващи данни от подобни породи животни сочат, че режимът на третиране най-малко при пределна доза (описан по-долу) не предизвиква видими токсични ефекти (включително липса на подтискане на пролиферацията на костния мозък или на други доказателства за цитотоксичност за прицелната тъкан), и ако не може да се очаква генотоксичност на базата на проучвания *in vitro* за генотоксичност или на данни от структурно подобни химикали, то тогава провеждането на пълно изследване с три нива на доза може да не се смята за необходимо, при условие, че е доказано, че изпитваният химикал (или химикали) достига до прицелната тъкан (костен мозък). В такива случаи може да бъде достатъчно и едно ниво на доза при пределната доза. За период на прилагане от 14 дни или повече пределната доза е 1 000 mg/kg телесно тегло/ден. За период на прилагане от по-малко от 14 дни пределната доза е 2 000 mg/kg телесно тегло/ден.

Прилагане на дозите

При планирането на изследването следва да бъде взет предвид очакваният път на експозиция на човека. Поради това като обосновани могат да бъдат избрани например пътища на експозиция като хранителен режим, питейна вода, локално подкожно, орално (през сонда), вдишване, интратрахеално или имплантация. Във всички случаи пътят следва да се избере така, че да осигури достатъчна експозиция на прицелната тъкан (или тъкани). Интраперитонеалното инжектиране обикновено не се препоръчва, тъй като то не е очакван път на експозиция на човека, и следва да бъде използвано само със специална научна обосновка. Ако изпитваният химикал се смеси в хранителния режим или в питейната вода, по-специално в случай на еднократно дозиране, следва да се положи грижа закъснението между консумацията на храна и вода и пробовземането да е достатъчно, за да позволи откриването на ефектите (вж. точка 37). Максималният обем течност, който може да се приложи еднократно със сонда или инжекция, зависи от големината на изпитваното животно. Обемът обичайно 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. Обеми, по-големи от този, следва да се обосновават. С изключение на дразнещи или корозивни изпитвани химикали, които обикновено предизвикват изострени ефекти при по-високи концентрации, варирането в изпитвания обем трябва да бъде сведено до минимум чрез регулиране на концентрацията с оглед осигуряване на прилагането на постоянен обем спрямо телесното тегло при всички нива на доза.

▼ **M7****График на третиране**

За предпочитане е да се извършват 2 или повече третириания, прилагани на интервали от 24 часа, особено когато това изпитване се интегрира в други изследвания за токсичност. Като алтернатива могат да се извършват еднократни третириания, ако това е научно обосновано (например при изпитвани химикали, за които е известно, че блокират клетъчния цикъл). Изпитваните химикали могат също да се прилагат като разделена доза, т.е. две или повече третириания в един и същи ден, разделени от не повече от 2—3 часа, за да се улесни прилагането на голям обем. При тези обстоятелства или при прилагане на изпитвания химикал чрез вдишване, графикът за пробовземане трябва да се определи въз основа на времето на последното прилагане на доза или края на експозицията.

Изпитването може да се извърши върху мишки или плъхове по един от следните три начина:

- a. Животните се третират с изпитвания химикал еднократно. Проби от костен мозък се вземат най-малко два пъти (от независими групи животни), като се започне не по-рано от 24 часа след третирането, но не повече от 48 часа след третирането, с подходящ интервал (интервали) между пробите, освен ако за изпитвания химикал е известно, че има изключително дълъг период на полуразграждане. Вземането на проби по-рано от 24 часа след третирането следва да бъде обосновано. Проби от периферна кръв се вземат най-малко два пъти (от една и съща група животни), като се започне не по-рано от 36 часа след третирането, на подходящ(и) интервал(и) след първото пробовземане, но не повече от 72 часа. При първото вземане на проба следва да бъдат третирани всички групи на определена доза и да бъдат взети проби за анализ; независимо от това, при пробовземане на по-късен етап (или етапи) е необходимо да се прилага само най-високата доза. Когато е установен положителен отклик след дадено вземане на проба, не се изисква допълнително вземане на проба, освен ако е необходима количествена информация за доза-отклик. Описаните времена на събиране са следствие на кинетиката на появата и изчезването на микроядрата в тези 2 тъканни компартмента.
- б. Ако се прилагат 2 третириания на ден (напр. две третириания на 24-часови интервали), следва да се вземат проби веднъж между 18-ия и 24-ия час след последното третиране за костния мозък или веднъж между 36-ия и 48-ия час след последното третиране за периферната кръв (30). Описаните времена на събиране са следствие на кинетиката на появата и изчезването на микроядрата в тези 2 тъканни компартмента.
- в. Ако се използват три или повече третириания на ден (напр. три или повече третириания на приблизително 24-часови интервали), проби от костен мозък следва да се вземат не по-късно от 24 часа след окончателното третиране, а от периферна кръв следва да бъдат събрани не по-късно от 40 часа след последното третиране (31). Този вариант на третиране съчетава комбинация от Comet изследване (например вземане на проби 2-6 часа след окончателното третиране) с изпитването за микроядра, и интегриране на изпитването за микроядра с изследванията за токсичност с повтаряща се доза. Събраните данни подсказват, че индуцирането на микроядра може да се наблюдава в тези по-широки времеви рамки при 3 или повече прилагания (15).

Могат да се използват други режими на дозиране или вземане на проби, когато това е относимо и научно обосновано, и да се улесни интегрирането с други изпитвания за токсичност.

Наблюдения

Общи клинични наблюдения върху изпитваните животни следва да бъдат извършвани поне един път дневно и клиничните признаци следва да бъдат записвани, за предпочитане по едно и също време (или времена) веднъж дневно и като се има предвид пиковият период за поява на очакваните ефекти след дозиране. По време на периода на дозиране всички животни следва да се наблюдават за заболяемост и смъртност поне два пъти дневно. Теглото на всички животни следва да се измерва в началото на изследването, поне един път в седмицата по време на изследвания с

▼ **M7**

повтаряща се доза, и при умъртвяването. При изследвания с продължителност най-малко една седмица консумацията на храна се измерва най-малко един път седмично. Ако изпитваният химикал се прилага чрез водата за пиене, консумацията на вода следва да се измерва при всяка смяна на водата и най-малко един път в седмицата. Животните, проявяващи нелетални признаци на прекомерна токсичност, следва да се умъртвят по хуманен начин преди приключването на периода на изпитване (28). При определени обстоятелства може да се проследява температурата на тялото на животните, тъй като предизвиканите от третирането хипер- и хипотермия допринасят за получаването на недостоверни резултати (32) (33) (34).

Експозиция на прицелна тъкан

В подходящо време (или времена) следва да се взема кръвна проба, за да се позволи изследване на плазмените нива на изпитваните химикали с цел доказване на експозиция на костен мозък, там където е обосновано и когато не са налични други данни за експозиция (вж. точка 48).

Подготовка на костния мозък/кръвта

Клетките на костния мозък обичайно се вземат от бедрената кост или големия пищял на животните непосредствено след умъртвяване по хуманен начин. Обичайно клетките се отстраняват, приготвят и оцветяват по установени методи. Малки обеми от периферна кръв могат да бъдат получени в съответствие с подходящи стандарти за хуманно отношение към животните или чрез метод, който позволява оцеляването на изпитваното животно, като например кръвотечение от опасната вена, или от друг подходящ кръвоносен съд, или чрез сърдечна пункция или вземане на проби от голям съд при умъртвяването на животни. За еритроцити както от костен мозък, така и от периферна кръв, в зависимост от метода за анализ, клетките могат да бъдат незабавно оцветени суправитално (16) (17) (18), препаратите за намазка се приготвят, след което се оцветяват за микроскопия, или се фиксират и оцветяват по подходящ начин за поточен цитометричен анализ. Използването на специфичен оцветител за ДНК (напр. акридиново оранжево (35) или Хъохст 33258 плюс пиронин-У (36)) може да елиминира някои от артефактите, свързани с използването на оцветител, който не е специфичен за ДНК. Това предимство не изключва използването на конвенционални багрила (напр. Giemsa за микроскопски анализ). Могат също да се използват допълнителни системи (напр. целулозни колонии за отстраняване на клетки с ядра (37), при условие че е доказано, че тези системи са съвместими с лабораторното приготвяне на пробата.

Когато тези методи са приложими, могат да се използват анти-кинетохорни антители (39), FISH с панцентромерни ДНК сонди (40) или *in situ* белязване с панцентромерно-специфични праймери, заедно с подходящо контрастно оцветяване на ДНК (41), за определяне на естеството на микроядрата (хромозома/хромозомен фрагмент) с цел определяне дали механизмът за индуциране на микроядра се дължи на кластогенна и/или анеугенна активност. Могат да бъдат използвани и други методи за разграничаване на кластогените от анеугените, ако те са се доказали като ефективни.

Анализ (ръчен и автоматизиран)

Всички предметни стъкла или проби за анализ, включително тези на положителните и отрицателните контроли, следва да се кодират независимо едно от друго преди всякакъв вид анализ и следва да се разбъркат на случаен принцип, така че преброяващият ръчно да не е запознат с условията на третирането; такова кодиране не е необходимо при използването на автоматизирани системи за преброяване, които не разчитат на визуална проверка и не могат да бъдат засегнати от пристрастността на оператора. Пропорцията на незрелите от общо (незрели + зрели) еритроцити се определя за всяко животно, като се отброяват общо най-малко 500 еритроцитата за костен мозък и 2 000 еритроцитата за периферна кръв (42). Най-малко 4 000 незрели еритроцитата на животно следва да се преброят за срещане на незрели еритроцити с микроядра (43). Ако базата данни за отрицателните контроли за предходни периоди показва, че средната фоновата честота на незрели еритроцити с микроядра е < 0,1 % в лабораторията, провеждаща изпитването, трябва да се обърне внимание на преброяването на допълнителни клетки. При анализа на проби делът на незрелите еритроцити в общия брой еритроцити в третираните животни не трябва да бъде по-малък от 20 % от дела на контролата на носител/разтворител при преброяване с микроскопия и не по-малък от приблизително 5 % от дела на контролата на носител/разтворител при преброяване на CD71+ незрели

▼ M7

еритроцити чрез цитометрични методи (вж. точка 31) (29). Например за изследване на костен мозък с преброяване чрез микроскопия, ако делът на контролата от незрели еритроцити в костния мозък е 50 %, горната граница на токсичността ще бъде 10 % незрели еритроцити.

Поради това, че далакът на плъховете задържа и унищожава еритроцити с микроядра, при анализа на периферна кръв от плъх, с цел поддържане на висока чувствителност на изследването, за предпочитане е анализът на незрелите еритроцити с микроядра да се ограничи до най-младата фракция. При използване на автоматизирани методи за анализ тези най-незрели еритроцити могат да бъдат идентифицирани въз основа на високото си съдържание на РНК или на високото равнище на трансферинови рецептори (CD71+), експресирани на повърхността им (31). Независимо от това, прякото сравнение на различни методи за оцветяване е показало, че задоволителни резултати могат да се получат с различни методи, включително с конвенционално оцветяване с акридиново оранжево (3) (4).

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Обработка на резултатите**

Индивидуалните данни за животните следва да се представят в таблица. За всяко изследвано животно следва да се дават поотделно броят на преброените незрели еритроцити, броят на незрелите еритроцити с микроядра и делът на незрелите еритроцити в общия брой на еритроцитите. При третиране на мишки непрекъснато в продължение на 4 или повече седмици също следва да се предоставят данните за броя и дела на зрелите еритроцити с микроядра, ако са събрани. Данните за токсичност за животните и за клиничните признаци следва също да бъдат протоколирани.

Критерии за приемливост

Следните критерии определят приемливостта на изпитването:

- а. Данните за паралелната отрицателна контрола се считат за приемливи за допълване към базата данни на дадената лаборатория за контролите за предходни периоди (вж. точки 15—18).
- б. Паралелните положителни контроли или контролите на преброяването трябва да предизвикват отклици, които са съвместими с генерираните в базата данни за положителните контроли за предходни периоди и да генерират статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола (вж. точки 24—25).
- в. Анализирани са подходящ брой дози и клетки.
- г. Критериите за избор на най-високата доза са съвместими с описаните в точки 30—33.

Оценяване и тълкуване на резултатите

При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно положителен:

- а. в най-малко една от третираните групи се наблюдава статистически значимо увеличение на честотата на незрелите еритроцити с микроядра в сравнение с паралелната отрицателна контрола,
- б. това увеличение е свързано с дозата поне за едно време на пробовземане при оценка, извършена с подходящ трендов тест, и
- в. някой от тези резултати е извън разпределението на данните за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. на основата на разпределение на Поасон с граници за контрол 95 %).

▼ **M7**

Ако в даден момент на пробовземане е разгледана само най-високата доза, изпитваният химикал се счита за ясно положителен, ако се наблюдава статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола и резултатите са извън разпределението на данните за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. на основата на разпределение на Поасон с граници за контрол 95 %). Препоръки за най-подходящите статистически методи могат да се намерят в литературните източници (44) (45) (46) (47). При провеждане на анализ доза-отклик трябва да бъдат анализирани най-малко три третириани с определена доза групи. При статистическите тестове за опитна единица следва да се използва отделното животно. Положителните резултати в изпитването за микроядра показва, че изпитваният химикал индуцира микроядра, които са резултат от хромозомно увреждане или увреждане на митотичния апарат в еритробластите на изпитвания животински вид. В случая, когато дадено изпитване е извършено с цел откриване на центромери в рамките на микроядра, даден изпитван химикал, който води до получаване на съдържащи центромера микроядра (центромерна ДНК или кинетохора, показващи загуба на цяла хромозома) е доказателство за това, че изпитваният химикал е анеуген.

При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно отрицателен, ако във всички изследвани опитни условия:

- а. в никоя от третирианите групи не се наблюдава статистически значимо увеличение на честотата на незрелите еритроцити с микроядра в сравнение с паралелната отрицателна контрола,
- б. в никое от времената на пробовземане няма свързано с дозата увеличение при оценка, извършена с подходящ трендов тест,
- в. всички резултати са в рамките на разпределението на данните за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. на основата на разпределение на Поасон с граници за контрол 95 %), и
- г. е наблюдавана експозиция на костен мозък на изпитвания химикал (или химикали).

Препоръки за най-подходящите статистически методи могат да се намерят в литературните източници (44) (45) (46) (47). Доказателствата за експозиция на костния мозък на изпитван химикал могат да включват намаляване на отношението на незрелите към зрелите еритроцити или измервания на нивата на изпитвания химикал в плазмата или в кръвта. При интравенозно приложение доказателства за експозиция не са необходими. Като алтернатива, за да се докаже експозицията на костния мозък могат да се използват данни за абсорбция — разпределение — метаболизъм — екскреция (АРМЕ), получени при провеждането на независимо проучване, с използване на същия път за прилагане и същия животински вид. Отрицателните резултати показват, че при условията за провеждане на изпитването изпитваният химикал не води до създаване на микроядра в незрелите еритроцити на изпитвания вид.

Няма изискване за потвърждаване на ясно положителен или ясно отрицателен отклик.

В случаите, когато отговорът не е ясно отрицателен или положителен и за да се подпомогне установяването на биологичната относимост на даден резултат (например при увеличение, което е слабо или с гранична стойност), данните следва да се оценят чрез експертна оценка и/или допълнителни изследвания от съществуващите приключени опити. В някои случаи би могло да се окаже полезно анализирането на повече клетки или извършването на опит с повторение, като се използват модифицирани опитни условия.

В редки случаи дори след допълнителни изследвания данните не позволяват стигането до заключение, че изпитваният химикал предизвиква положителни или отрицателни резултати, и следователно за изследването се заключава, че е неясно.

Протокол от изпитването

Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Обобщение

Изпитван химикал:

— източник, номер на партидата, крайна дата за употреба, ако има такава;

▼ M7

— стабилност на изпитвания химикал, ако е известна.

Вещество с една съставка:

— външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;

— химична идентификация, като наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, SMILES или InChI код, структурна формула, чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и др.

Вещество с повече съставки, UVCB и смеси:

— характеризирани, доколкото е възможно, от химическата идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Приготвяне на химикала за изпитване:

— обосновка за избора на носител;

— разтворимост и стабилност на изпитвания химикал в разтворител/носител, ако са известни;

— приготвяне на формулировките за хранителен режим, питейна вода или инхалация;

— аналитични определяния, свързани с формулировките (напр. устойчивост, хомогенност, номинални концентрации), когато са извършвани такива;

Изпитвани животни:

— използван вид/порода и обосновка за избора;

— брой, възраст и пол на животните;

— източник за доставка на животните, условия на отглеждане, хранителен режим и т.н.;

— метод за еднозначно идентифициране на животните;

— за краткосрочни изследвания: индивидуално тегло на животните в началото и в края на изпитването; за изследвания, по-дълги от една седмица: индивидуално телесно тегло по време на изследването и консумация на храна. следва да бъдат включени размахът, средната стойност и стандартното отклонение на телесното тегло за всяка група.

Условия на изпитването:

— данни за положителните и отрицателните (носител/разтворител) контроли;

— данни от изследването за установяване на обхвата, ако е проведено;

— обосновка за избора на нивото на доза;

— подробна информация за приготвянето на изпитвания химикал;

— подробна информация относно прилагането на изпитвания химикал;

— обосновка на пътя и продължителността на прилагането;

— методи за проверка дали изпитваният химикал (химикали) е достигнал до общото кръвообращение или до прицелната тъкан;

▼ M7

- действителна доза (mg/kg телесно тегло дневно), изчислена от концентрацията на изпитвания химикал в хранителния режим/питейната вода (ppm), и консумация, ако е приложимо;
- подробности относно качество на храната и водата;
- метод за умъртвяване;
- метод за аналгезия (когато е използван);
- подробно описание на графици на третиране и вземане на проби и обосновки за направения избор;
- методи на приготвяне на предметни стъкла;
- процедури за изолиране и съхраняване на проби;
- методи за измерване на токсичността;
- критерии за преброяване на незрели еритроцити с микроядра;
- брой анализирани клетки/животно при определяне на честотата на незрели еритроцити с микроядра и за определяне на отношението на незрелите към зрелите еритроцити;
- критерии за приемливост на изпитването;
- методи, като използване на анти-кинетохорни антители или специфични за центромерата ДНК сонди за определяне дали микроядрата съдържат цели хромозоми или хромозомни фрагменти, ако е приложимо.

Резултати:

- състояние на животните преди и през целия период на изпитване, включително признаци на токсичност;
- дял на незрелите еритроцити в общия брой еритроцити;
- брой на незрелите еритроцити с микроядра, посочен отделно за всяко животно;
- средна стойност \pm стандартно отклонение на незрелите еритроцити с микроядра на група;
- взаимоотношение доза-отклик, където е възможно;
- статистически анализи и използвани методи;
- данни за паралелни отрицателни и положителни контроли с размах, средни стойности и стандартни отклонения;
- данни за отрицателни и положителни контроли за предходни периоди, с размах, средни стойности и стандартни отклонения, и 95 % граници за контрол за разпределението, както и обхванат времеви период и брой на точките с данни;
- данни, доказващи експозицията на костния мозък;
- данни за характеризирани, показващи дали микроядрата съдържат цели хромозоми или хромозомни фрагменти, ако е приложимо;
- критериите за положителен или отрицателен отклик, които са изпълнени.

▼ M7

Обсъждане на резултатите.

Заклучение.

Позовавания.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD(2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Hayashi, M. *et al.* (2007), *in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 10-30.
- (3) MacGregor, J.T. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, *Toxicology Sciences*, Vol. 94/1, pp. 92-107.
- (4) Dertinger, S.D. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, *Toxicological Sciences*, Vol. 94/1, pp. 83-91.
- (5) Dertinger, S.D. *et al.* (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, *Mutagenesis*, Vol. 26/1, pp. 139-145.
- (6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, *Mutation Research*, Vol. 370/1, pp. 65-73.
- (7) Asano, N. *et al.* (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitaly stained peripheral blood cells, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 404/1-2, pp. 149-154.
- (8) Styles, J.A. *et al.* (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, *Cytometry*, Vol. 44/2, pp. 153-155.
- (9) Heddle, J.A. (1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 187-190.
- (10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 31/1, pp. 9-15.
- (11) Heddle, J.A. *et al.* (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 123/1, pp. 61-118.
- (12) Mavournin, K.H. *et al.* (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 239/1, pp. 29-80.
- (13) MacGregor, J.T. *et al.* (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, *Developments in Toxicology Environmental Science*, Vol. 11, pp. 555-558.

▼ M7

- (14) MacGregor, J.T. *et al.* (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 189/2, pp. 103-112.
- (15) MacGregor, J.T. *et al.* (1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, *Fundamental and Applied Toxicology*, Vol. 14/3, pp. 513-522.
- (16) Hayashi, M. *et al.* (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 245/4, pp. 245-249.
- (17) CSGMT/JEMS.MMS — The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 278/2-3, pp. 83-98.
- (18) CSGMT/JEMS.MMS — The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), *Mutagenesis*, Vol. 10/3, pp. 153-159.
- (19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 23/4, pp. 239-273.
- (20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 453/1, pp. 45-50.
- (21) Hayes, J. *et al.* (2009), The rat bone marrow micronucleus test—study design and statistical power, *Mutagenesis*, Vol. 24/5, pp. 419-424.
- (22) Wakata, A. *et al.* (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 32/1, pp. 84-100.
- (23) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (24) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (25) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-120.
- (26) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 293-304.
- (27) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼ M7

- (28) OECD (2000), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.
- (29) LeBaron, M.J. *et al.* (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/3, pp. 222-228.
- (30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, Vol. 10/4, pp. 313-319.
- (31) Hayashi, M. *et al.* (2000), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 234-252.
- (32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 390/1-2, pp. 79-83.
- (33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 413/1, pp. 7-14.
- (34) Spencer, P.J. *et al.* (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, *Toxicological Sciences*, Vol. 97/1, pp. 120-127.
- (35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Research Letters*, Vol. 120/4, pp. 241-247.
- (36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269-275.
- (37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 213/1, pp. 91-104.
- (38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, *Mutation Research*, Vol. 439/1, pp. 121-126.
- (39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochores antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, *Mutagenesis*, Vol. 5/4, pp. 411-415.
- (40) Miller, B.M. *et al.* (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297-302.
- (41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, *American Journal of Medical Genetics*, Vol. 107/2, pp. 99-104.
- (42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 347/2, pp. 97-99.
- (43) OECD (2014), „Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

▼M7

- (44) Richold, M. *et al.* (1990), „In Vivo Cytogenetics Assays“, in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

- (45) Lovell, D.P. *et al.* (1989), „Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays“, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

- (46) Hayashi, M. *et al.* (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49-52.

- (47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 469/2, pp. 233-241.

▼ M7*Допълнение 1*

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Центромера: област (области) от хромозомата, с която нишки от делителното вретено се свързват по време на клетъчното делене, като така позволяват методично придвижване на дъщерните хромозоми към полюсите на дъщерните клетки.

Химикал: вещество или смес.

Еритробласт: ранен етап от развитието на еритроцита, непосредствено предхождащ незрелия еритроцит, в който клетката все още съдържа ядро.

Кинетохора: белтъчна структура, която се образува върху центромерата в еукариотни клетки, свързва хромозомата към полимерите на микротръбички от митотичното вретено по време на митозата и мейозата и функционира по време на клетъчното делене за разделяне на сестринските хроматиди една от друга.

Микроядро: малки ядра, отделни от главното клетъчно ядро и в допълнение към него, образувани по време на телофазата от митозата (мейозата) от изоставащи хромозомни фрагменти или цели хромозоми.

Нормохроматичен или зрял еритроцит: напълно зрял еритроцит, който е загубил остатъчната РНК, която остава след загубата на ядрото и/или е загубил други краткоживеещи клетъчни маркери, които типично изчезват след загубата на ядрото след последното делене на еритробласта.

Полихроматичен или незрял еритроцит: Новообразуван еритроцит в междинен етап на развитие, който се оцветява както със сините, така и с червените компоненти на класическо оцветяване на кръв, като това по Wright-Giemsa, поради наличие на остатъчна РНК в новообразуваната клетка. Такива новообразувани клетки са приблизително същите като ретикулоцитите, които се визуализират чрез витално оцветяване, което води до групиране на остатъчната РНК в ретикулум. Понастоящем за идентифициране на новообразувани червени кръвни клетки често се използват други методи, включително монохроматично оцветяване на РНК с флуоресцентни оцветители или белязване на краткоживеещи повърхностни маркери, като например CD71, с флуоресцентни антитела. Полихроматичните еритроцити, ретикулоцитите и CD71-положителните еритроцити са незрели еритроцити, но всеки от тях в известна степен има по-различно възрастово разпределение.

Ретикулоцит: Новообразуван еритроцит, оцветен с витално оцветяване, което води до групиране на остатъчната клетъчна РНК в специфичен ретикулум. Ретикулоцитите и полихроматичните еритроцити имат сходно разпределение на клетъчната възраст.

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

▼ **M7**

Допълнение 2

ФАКТОРНИЯТ ДИЗАЙН ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА РАЗЛИКИ МЕЖДУ ПОЛОВЕТЕ ПРИ ИЗСЛЕДВАНЕ *IN VIVO* ЗА МИКРОЯДРА**Факторният дизайн и неговият анализ**

При този дизайн се изпитват минимум 5 мъжки и 5 женски животни на всяко равнище на концентрация, в резултат от което в дизайна се използват най-малко 40 животни (20 мъжки и 20 женски животни, плюс относимите положителни контроли).

Дизайнът, който е един от по-простите видове факторен дизайн, е равностоеен на двуфакторния дисперсионен анализ, с пола и равнището на концентрация като главни ефекти. Данните могат да бъдат анализирани с помощта на множество стандартни статистически софтуерни пакети като например SPSS, SAS, STATA, Genstat, както и с използване на R.

Анализът разпределя варирането в набора от данни като вариране между полове, вариране между концентрациите и вариране, свързано с взаимодействието между полове и концентрациите. Всеки от компонентите се тества спрямо оценка на варирането между животните за повторения в рамките на групите животни от един и същ пол, които са на една и съща концентрация. Пълни подробности за използваната методика са на разположение в множество стандартни статистически учебници (вж. позоваванията) и в помощните текстове, предоставени със статистическите пакети.

Анализът продължава с проверка на компонента за взаимодействие пол x концентрация в ANOVA таблицата ⁽¹⁾. При липсата на значим компонент за взаимодействие комбинираните стойности за полове или за равнищата на концентрация предоставят валидни статистически тестове между равнищата, въз основа на компонента за обединеното вътрешногрупово вариране на ANOVA.

Анализът продължава като се раздели оценката на варирането между концентрациите на контрасти, които дават възможност за тест за линейни и квадратични контрасти на отклиците за равнищата на концентрация. Когато е налице значимо взаимодействие пол x концентрация, този компонент също може да се подраздели на контрасти за линейно x пол и квадратично x пол взаимодействие. Тези компоненти предоставят възможност за тестове дали концентрационните отклици са успоредни за двата пола, или има диференциален отклик между двата пола.

Оценката на обединеното вътрешногрупово вариране може да се използва за предоставяне на възможност за тестове за сравнения по двойки на разликата между средните стойности. Тези сравнения могат да се правят между средните стойности за двата пола и между средните стойности за различните равнища на концентрация, като за сравнения с равнищата за отрицателните контроли. В случаите, когато е налице значимо взаимодействие, могат да се направят сравнения между средните стойности за различни концентрации в рамките на даден пол, или между средните стойности за полове при една и съща концентрация.

Позовавания

Съществуват много статистически учебници, в които се разглеждат теорията, планирането, методологията, анализа и тълкуването на факторните дизайни, вариращи от най-простите двуфакторни анализи до по-сложните форми, използвани в методологията „Планиране на опити“. По-долу е представен неизчерпателен списък. Някои книги предоставят практически примери за сравними модели, в някои случаи с код за провеждането на анализите с използване на различни софтуерни пакети.

⁽¹⁾ Статистиците, които използват подход за моделиране, като например обобщени линейни модели (GLM), може да подхождат към анализа по различен, но сравним начин, но не получават непременно традиционната ANOVA таблица, която датира от алгоритмичните подходи за изчисляване на статистически данни, разработени в епохата преди появата на компютрите.

▼M7

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). *Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application*. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). *Experiments: Planning, Analysis and Optimization*. John Wiley & Sons Inc.

▼B**Б.13/14. МУТАГЕННОСТ — БАКТЕРИИ ЗА ТЕСТВАНЕ НА ОБРАТНИ МУТАЦИИ****1. МЕТОД**

Настоящият метод е изцяло подобен на бактериалния тест за обратни мутации на OECD TG 471 от 1997 г.

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Бактериалният тест за обратни мутации използва изискващи аминокиселина щамове на *Salmonella typhimurium* и на *Escherichia coli*, за да се открият точкови мутации, състоящи се в заместване, добавяне или делеция на една или няколко ДНК базови двойки (1) (2) (3). Принципът на настоящия бактериален тест за обратни мутации се състои в това, че той открива мутации, които обръщат мутациите, налични в тестваните щамове, и възстановяват функционалните способности на бактериите да синтезират основна аминокиселина. Ревертантните бактерии се откриват по способността им да растат при отсъствието на аминокиселина, изисквана от родителския тестван щам.

Точковите мутации са причината за много човешки генетични заболявания и има фактически доказателства, че точковите мутации в онкогени и туморопотискащи гени на соматични клетки участват в образуването на тумори у хора и експериментални животни. Бактериалният тест за обратни мутации е бърз, евтин и относително лесен за провеждане. Много от тестваните щамове имат няколко характеристики, които ги правят по-чувствителни за откриване на мутации, включително реагиращи секвенции на ДНК в положение на реверсия, повишена клетъчна пропускливост към големи молекули и елиминиране на системи за репарация на ДНК или увеличаването на репарационните процеси на ДНК, при които са възможни грешки. Специфичността на тестваните щамове може да даде полезна информация за типовете мутации, които се индуцират от генотоксични агенти. За бактериалните тестове за обратни мутации съществува огромна база данни с резултати за голямо разнообразие от структури, а също така са разработени и добре установени методологии за тестване на химикали с различни физикохимични свойства, в т.ч. летливи съединения.

Вижте също Общо въведение, част Б.

1.2. ДЕФИНИЦИИ

Тест за обратни мутации в *Salmonella typhimurium* или *Escherichia coli* открива мутация в нуждаещия се от аминокиселина щам (съответно хистидин или триптофан), за да се получи независим от външна доставка на аминокиселина щам.

Мутагени — заместители на основна двойка, са агенти, причиняващи основна промяна в ДНК. В реверсивен тест тази промяна може да възникне от страната на първоначалната мутация или от втора страна в бактериалния геном.

Фреймшифт мутагени са агенти, предизвикващи добавянето или делецията на една или повече основни двойки в ДНК, като по този начин се променя четящата рамка в РНК.



1.3. НАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

Бактериалният тест за обратни мутации използва прокариотни клетки, които се различават от клетките на бозайниците по фактори, като поглъщане, метаболизъм, хромозомна структура и ДНК репарационни процеси. Провежданите тестове *in vitro* по принцип изискват използването на екзогенен източник на метаболитна активация. Системите *in vitro* за метаболитна активация не могат изцяло да имитират условията *in vivo* на бозайниците. Следователно тестът не осигурява пряка информация за мутагенната и канцерогенната сила на дадено вещество при бозайници.

Бактериалният тест за обратни мутации обикновено се използва като първоначално откриване на генотоксична дейност, и в частност на дейност, индуцираща точкова мутация. Обширна база данни е показала, че много химикали, които са положителни при настоящия тест, също проявяват мутагенна активност при други тестове. Има примери за мутагенни агенти, които не се откриват с настоящия тест; причините за тези недостатъци могат да се припишат на специфичното естество на установената крайна точка, разлики в метаболитната активация или разлики в бионаличността. От друга страна, факторите, които подобряват чувствителността на бактериалния тест за обратни мутации, могат да доведат до надценяване на мутагенна активност.

Бактериалният тест за обратни мутации може да не е подходящ за оценката на някои класове химични вещества, например някои съединения с високо бактерицидно съдържание (напр. някои антибиотици) и тези, за които се смята (или се знае), че си взаимодействат конкретно със системата на клетъчна репликация у бозайниците (напр. някои инхибитори на топоизомеразата и някои нуклеозидни аналози). В подобни случаи може би по-подходящи са тестовете за мутации при бозайници.

Въпреки че много съединения, които са положителни в настоящия тест, са канцерогени за бозайниците, съответствието не е абсолютно. То зависи от химичния клас, а има канцерогени, които не се откриват с настоящия тест, тъй като те действат чрез други, негенотоксични механизми или механизми, които не се срещат в бактериалните клетки.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ТЕСТА

Суспензии на бактериални клетки се експонират на въздействието на тестваното вещество с наличие и отсъствие на система за екзогенна метаболитна активация. При метода с посяване на блюдо тези суспензии се смесват с пласт от агар и незабавно се посяват в блюдо върху минимална среда. При метода с предварително инкубиране сместа за обработване се инкубира и след това се смесва с пласт от агар, преди да се посеете в блюдо върху минимална среда. При двата метода след два или три дни инкубация се преброяват ревертантните колонии и се сравняват с броя на спонтанни ревертантни колонии в контролни плочки с разтворител.

Описани са няколко процедури за провеждането на бактериалния тест за обратни мутации. Измежду най-често използваните са методът с посяване в блюдо (1) (2) (3) (4), прединкубационният метод (2) (3) (5) (6) (7) (8), флукуационният метод (9) (10) и суспензионният метод (11). Описани са и модификации за тестване на газове или пари (12).

▼B

Описаните в метода процедури се отнасят главно за метода с посяване в блюдо и прединкубационния метод. Който и да е от тях е приемлив за провеждане на опити както със, така и без метаболитна активация. Някои вещества могат да се открият по-ефикасно, като се използва прединкубационният метод. Тези вещества принадлежат към химични класове, включващи алифатни нитрозамини с къси вериги, двувалентни метали, алдехиди, азо багрила и диазо съединения, пирилизидинови алкалоиди, алилни съединения и нитросъединения (3). Признава се също, че някои класове мутагени не винаги се откриват със стандартните процедури, като метода на посяване в блюдо или прединкубационния метод. Те следва да се смятат за „специални случаи“ и силно се препоръчва за откриването им да се използват други процедури. Следните „специални случаи“ биха могли да бъдат идентифицирани (заедно с примери за процедурите, които биха могли да се използват за откриването им): азо багрила и диазо съединения (3) (5) (6) (13), газове и летливи химикали (12) (14) (15) (16) и гликозиди (17) (18). Отклонение от стандартната процедура следва да бъде научно обосновано.

1.5. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ТЕСТА

1.5.1. Подготовка

1.5.1.1. Бактерии

Свежи бактериални култури следва да се отглеждат до късната експоненциална или ранна стационарна фаза на растеж (приблизително 10^9 клетки на ml). Не следва да се използват култури в късна стационарна фаза. От първостепенна важност е културите, използвани в опита, да съдържат висок титър жизнеспособни бактерии. Титърът може да се илюстрира с контролни данни от предишни изследвания за кривите на растежа или във всеки анализ на опита чрез определяне количествата на жизнеспособни клетки чрез експеримент с посев в блюдо.

Препоръчителната температура на инкубация е 37 °C.

Следва да се използват най-малко пет бактериални щама. Те включват четири щама на *Salmonella typhimurium* (TA 1535; TA 1537 или TA97a или TA97; TA98; и TA100), които са показали, че са надеждни и репродуктивно реагиращи между лабораториите. Тези четири щама на *Salmonella typhimurium* имат GC основни двойки на главната реверсивна страна и е известно, че те не биха могли да открият някои оксидиращи мутагени, напречно свързващи се агенти и хидразини. Подобни вещества могат да се открият с щамове на *Escherichia coli* WP2 или *Salmonella typhimurium* TA102 (19), които имат AT основна двойка на главната реверсивна страна. Следователно препоръчителната комбинация от щамове е:

— *Salmonella typhimurium* TA1535, и

— *Salmonella typhimurium* TA1537 или TA97 или TA97a, и

— *Salmonella typhimurium* TA98, и

— *Salmonella typhimurium* TA100, и

— *Escherichia coli* WP2 uvrA, или *Escherichia coli* WP2 uvrA (pKM101), или *Salmonella typhimurium* TA102.

За да се открият напречно свързващи се мутагени, може би е за предпочитане да се включи TA102 или да се добави щам of *Escherichia coli* с изобилие от ДНК репарации (напр. *Escherichia coli* WP2 или *Escherichia coli* WP2 (pKM101).

▼B

Следва да се използват установените процедури за приготвяне на изходна култура, проверка на маркера и съхранение. Следва да се посочи необходимата за растеж аминокиселина за приготвянето на всяка замразена изходна култура (хистидин за щамове на *Salmonella typhimurium* и триптофан за щамове на *Escherichia coli*). По аналогичен начин следва да се проверят други фенотипни характеристики, а именно: наличието или отсъствието на плаزمиди на R-фактор, при необходимост (т.е. устойчивост на ампицилин в щамове TA98, TA100 и TA97a или TA97, WP2 *uvrA* и WP2 *uvrA* (pKM101), и устойчивост на ампицилин + тетрациклин в щам TA 102); наличието на характерни мутации (т.е. *gfa* мутация в *Salmonella typhimurium* чрез чувствителност към кристално виолетово, и *uvrA* мутация в *Escherichia coli* или *uvrB* мутация в *Salmonella typhimurium* чрез чувствителност към ултравиолетова светлина) (2) (3). Щамове следва също така да произвеждат спонтанни ревертантни колонии в блюдо в рамките на честотните обхвати, които се очакват от контролните данни, получени от предишни изследвания в лабораторията и, за предпочитане, в обхвата, описан в литературата.

1.5.1.2. *Среда*

Използва се подходящ минимален агар (напр. съдържащ минимална среда Е на Фьогел-Бонер и глюкоза), и пласт от агар, съдържащ хистидин и биотин или триптофан, за да се получат няколко клетъчни деления (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Метаболична активация*

Бактериите следва да се експонират на тестваното вещество, както при наличие, така и при липса на подходяща система за метаболична активация. Най-често използваната система е постмитохондрична фракция (S9) с добавка на ко-фактор, приготвена от черните дробове на гризачи, третирани с ензимно-индуциращи реактиви, като Ароклор 1254 (1) (2) или смес от фенобарбитон и β-нафтофлавоин (18) (20) (21). Постмитохондричната фракция обичайно се използва с концентрации в обхвата от 5 до 30 % v/v в сместа S9. Изборът и състоянието на системата за метаболична активация може да зависи от класа на тествания химикал. В някои случаи е подходящо да се използва повече от една концентрация на постмитохондрична фракция. За азо багрила и диазо съединения може да е подходяща редуцираща система за метаболична активация (6) (13).

1.5.1.4. *Тествано вещество/приготвяне*

Твърдите вещества за теста следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители и, при необходимост, да се разреждат преди третиране на клетките. Течните вещества за теста могат да се добавят директно към системите за тестване и/или да се разреждат преди третиране. Следва да се използват пресни препарати на тестваното вещество, освен ако данните за устойчивостта му не показват, че може да се съхранява.

Не следва да има съмнения за химическа реакция на разтворителя/носителя с тестваното вещество и той следва да е съвместим с оцеляването на бактериите и активността на S9 (22). Ако се използват други освен добре познатите разтворители/носители, включването им в теста следва да се подкрепи от данни за съвместимостта им. Препоръчва се, винаги когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на воден разтворител/носител. При тестването на вещества, нестабилни във вода, използваните органични разтворители не следва да съдържат вода.

▼B1.5.2. **Условия за провеждане на теста**1.5.2.1. *Тествани щамове (вж. 1.5.1.1)*1.5.2.2. *Концентрация на експозиция*

Измежду критериите, които следва да се вземат предвид при определянето на най-високото количество на тестваното вещество, са цитотоксичността и разтворимостта в окончателната смес за третиране.

Полезно би било да се определят токсичността и неразтворимостта в предварителен опит. Цитотоксичността може да се открие чрез намаляване на броя на ревертантните колонии, почистване или намаляване на фона, или степента на оцеляване на третираните култури. Цитотоксичността на едно вещество може да се промени в присъствието на системи за метаболитна активация. Неразтворимостта следва да се оценява като утаяване в крайната смес при реални условия за провеждане на теста и е видима с просто око.

Препоръчителната максимална тестова концентрация за разтворими нецитотоксични вещества е 5 mg/блюдо или 5 µl/блюдо. За нецитотоксични вещества, които не са разтворими при 5 mg/блюдо или 5 µl/блюдо, една или повече тествани концентрации следва да са неразтворими в крайната смес за третиране. Тествани вещества, които вече са цитотоксични под 5 mg/блюдо или 5 µl/блюдо, следва да се тестват до границата на цитотоксична концентрация. Преципитатът не следва да влияе на отчитането.

Използват се най-малко пет различни, даващи възможност за анализ концентрации на тестваното вещество на приблизително полулогаритмични (т.е. $\sqrt{10}$) интервали между тестваните точки за начален опит. Могат да бъдат подходящи и по-малки интервали, когато се изследва реакция на концентрация. Тестване над концентрацията от 5 mg/блюдо или 5 µl/блюдо може евентуално да се извършва, когато се изследват вещества, съдържащи значителни количества потенциално мутагенни примеси.

1.5.2.3. *Отрицателни и положителни контроли*

Във връзка с анализа на всеки отделен опит следва да се включват паралелни положителни и отрицателни (разтворител или носител) контроли със специфичен щам, както със, така и без метаболитна активация. Следва да се избират положителните контролни концентрации, показващи ефективно провеждане на всеки опит.

За тестове със система за метаболитна активация референтното(ите) вещество(а) за положителни контроли се избира(т) въз основа на вида на използваните бактериални щамове.

Следните вещества са примери за подходящи положителни контроли за тестове с метаболитна активация:

CAS №	EINECS №	Вещество
781-43-1	212-308-4	9,10-диметилантрацен
57-97-6	200-359-5	7,1 2-диметилбенз[а]антрацен
50-32-8	200-028-5	бензо[а]пирен
613-13-8	210-330-9	2-аминоантрацен

▼B

CAS №	EINECS №	Вещество
50-18-0		циклофосфамид монохидрат
6055-19-2	200-015-4	циклофосфамид

Следното вещество е подходяща положителна контрола за метода с редуцираща метаболитна активация:

CAS №	EINECS №	Вещество
573-58-0	209-358-4	конгочервено

Не следва да се използва 2-аминоантрацен като единствен показател за ефикасността на сместа S9. Ако се използва 2-аминоантрацен, всяка партида от S9 следва също да се характеризира с мутаген, изискващ метаболитна активация от микрозомни ензими, напр., бензо[а]пирен, диметилбензантрацен.

Следните вещества са примери на специфични по щам положителни контроли за тестове без система за екзогенна метаболитна активация:

CAS №	EINECS №	Вещество	Щам
26628-22-8	247-852-1	натриев азид	ТА 1535 и ТА 100
607-57-8	210-138-5	2-нитрофлуорен	ТА 98
90-45-9	201-995-6	9-амноакридин	ТА 1537, ТА 97 и ТА 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	ТА 1537, ТА 97 и ТА 97a
80-15-9	201-254-7	кумол хидропероксид	ТА 102
50-07-7	200-008-6	митомицин С	WP2 uvrA и ТА 102
70-25-7	200-730-1	N-етил-N-нитро-N-нитрозогуанидин	WP2, WP2uvrA и WP2uvrA (pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-нитрохинолин-1-оксид	WP2, WP2uvrA и WP2uvrA (pKM101)
3688-53-7		фурилфурамид (AF2)	щамове, съдържащи плазмид

Могат да се използват други референтни вещества за положителни контроли. За положителна контрола следва да се разглежда използването на химикали, принадлежащи към химичен клас, когато такива са налични.

Следва да бъдат включени отрицателните контроли, състоящи се само от разтворител или носител в средата за третиране, и третирани по същия начин както опитните групи. В допълнение към това следва също да се използват нетретирани контроли, освен ако няма исторически контролни данни от предишни изследвания, показващи, че избраният разтворител не причинява вредни или мутагенни ефекти.

▼ B**1.5.3. Процедура**

При метода на посяване в блюдо (1) (2) (3) (4) без метаболитна активация се смесват обичайно 0,05 ml или 0,1 ml тестовите разтвори, 0,1 ml свежа бактериална култура (съдържаща около 10^8 жизнеспособни клетки) и 0,5 ml стерилен буфер с 2,0 ml слой от агар. За тест с метаболитна активация се смесват обикновено 0,5 ml от сместа за метаболитна активация, съдържаща адекватно количество постмитохондрична фракция (в границите от 5 до 30 % v/v в сместа за метаболитна активация), със слой от агар (2,0 ml) заедно с бактериите и тестваното вещество/тестван разтвор. Съдържанието на всяка епруветка се смесва и изсипва върху повърхността на блюдо с минимален агар. Слой от агар се оставя да се втвърди преди инкубацията.

При прединкубационния метод (2) (3) (5) (6) тестваното вещество/тестваният разтвор се инкубира предварително с тествания щам (съдържащ около 10^8 жизнеспособни клетки) и стерилен буфер или система за метаболитна активация (0,5 ml) обичайно за 20 или повече минути при 30—37 °C преди смесването със слоя от агар и изливането върху повърхността на блюдо с минимален агар. Обикновено 0,05 или 0,1 ml от тестваното вещество/тестван разтвор, 0,1 ml бактерии и 0,5 ml от S9 или стерилен буфер се смесват с 2,0 ml слой от агар. Епруветките се аерират по време на предварителната инкубация с шейкър.

За адекватна оценка на променливостта при всяко ниво на дозиране се използват по три блюда. Използването на две блюда е приемливо, когато е научно обосновано. Загубата по невнимание на блюдо не обезсилва опита по необходимост.

Газообразни или летливи вещества се изпитват чрез подходящи методи, като например в запечатани съдове (12) (14) (15) (16).

1.5.4. Инкубация

Всички блюда на даден тест се инкубират при 37°C за 48—72 часа. След инкубационния период се преброяват ревертантните колонии на блюдо.

2. ДАННИ**2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Данните се представят като брой ревертантни колонии на блюдо. Също се дава броят ревертантни колонии както върху блюдата за отрицателни (контрола на разтворител и нетретирана контрола, ако се използва), така и за положителните контроли. Представят се броят на отделните блюда, средният брой ревертантни колонии на блюдо и стандартното отклонение за тестваното вещество и положителните и отрицателните (третиран и/или разтворител) контроли.

Няма изискване за потвърждаване на явно положителна реакция. Резултатите, които не са категорични, следва да се изяснят с още тестове, като за предпочитане е да се изменят условията на експеримента. Отрицателните резултати следва да се потвърдят за всеки случай поотделно. В случаите, когато не се смята необходимо потвърждаването на отрицателни резултати, следва да се даде обосновка. Изменението на параметрите на изследването с цел разширяване на обхвата на оценяваните условия следва да се вземе под внимание при следващите експерименти. Параметрите на изследването, които биха могли да се променят, включват границите на концентрацията, метода на третиране (посев върху блюдо или течна прединкубация) и условията на метаболитна активация.

▼B

2.2. ОЦЕНКА И ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Има няколко критерия за определяне на положителен резултат, като например увеличение на концентрацията спрямо тествания обхват и/или репродуцируемо увеличение при една или повече концентрации на броя на ревертантни колонии на блюдо в поне един шам със или без система за метаболитна активация (23). Първо следва да се разгледа биологичната значимост на резултатите. При оценката на резултатите от теста биха могли да се използват статистически методи (24). Статистическата значимост не следва да е единственият решаващ фактор за положителна реакция.

Тествано вещество, за което резултатите не отговарят на горните критерии, се смята за немутагенно в настоящия тест.

Въпреки че повечето експерименти дават ясно положителни или отрицателни резултати, в редки случаи наборът данни изключва възможността да се направи категорична преценка за активността на тестваното вещество. Резултатите могат да останат двусмислени или под въпрос, независимо от това колко пъти е повторен опитът.

Положителните резултати от бактериалния тест за обратни мутации показват, че веществото индуцира точкови мутации чрез заместване на бази или фреймшифтове в генома на *Salmonella typhimurium* и/или *Escherichia coli*. Отрицателните резултати показват, че при условията за провеждане на теста тестваното вещество не е мутагенно в тествания вид.

3. ДОКЛАДВАНЕ

ДОКЛАД ЗА ТЕСТА

Докладът за теста следва да включва следната информация:

Разтворител/носител:

- обосновка за избора на носител,
- разтворимост и стабилност на тестваното вещество в разтворител/носител, ако са известни.

Щамове:

- използвани щамове,
- брой на клетки на култура,
- характеристики на щама.

Условия за провеждане на теста:

- количество тествано вещество на блюдо (mg/блюдо или µl/блюдо) с основна причина за избора на доза и брой на блюдата на концентрация,
- използвани среди,
- тип и състав на системата за метаболитна активация, в т.ч. критерии за приемливост,
- процедури на третиране.

Резултати:

- признаци на токсичност,
- признаци на утаяване,
- брой отделни блюда,

▼B

- среден брой на ревертантните колонии на блюдо и стандартно отклонение,
- взаимоотношение доза-реакция, където е възможно,
- статистическа оценка, ако има такава,
- паралелни отрицателни (разтворител/носител) и положителни контролни данни с обхват, средни стойности и стандартни отклонения,
- —отрицателни (разтворител/носител) и положителни контролни данни от предишни изследвания, с обхват, средни стойности и стандартни отклонения.

Обсъждане на резултатите.

Заклучения.

4.

ПРЕПРАТКИ

- (1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347—364.
- (2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173—215.
- (3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C, Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217—233.
- (4) Kier, L. D., Brusick D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), *The Salmonella typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program*, *Mutation Res.*, 168, pp. 69—240.
- (5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters* 1, pp. 91—96.
- (6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, w: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273—285.
- (7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, w: *Basic Mutagenicity TestS: UKEMS Part 1 Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13—61.
- (8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety*, 8, pp. 167—177.
- (9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutation Res.*, 38, pp. 33—42.
- (10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, w: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141—161.

▼B

- (11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453—465.
- (12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, pp. 335—344.
- (13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.*, 136, pp. 33—47.
- (14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2—141.
- (15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F., Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249—258.
- (16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421—441.
- (17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, pp. 3780—3782.
- (18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 4961—4965.
- (19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis*, 5, pp. 285—291.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, w: In *vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85—88.
- (21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175—177.
- (22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, pp. 343—350.
- (23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, pp. 83—91.

▼ B

- (24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, w: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28—65.

▼ M7

▼B

Б.17. МУТАГЕННОСТ — *IN VITRO* ТЕСТ ЗА КЛЕТЪЧНИ ГЕННИ МУТАЦИИ ПРИ БОЗАЙНИЦИ

1. МЕТОД

Настоящият метод е изцяло подобен kd теста *in vitro* за клетъчни генни мутации при бозайници на ОИСП TG 476 от 1997 г.

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Тестът *in vitro* за клетъчни генни мутации при бозайници може да се използва за откриване на генни мутации, индуцирани от химични вещества. Подходящи клетъчни линии са L5178Y на миши лимфомни клетки, линиите CHO, CHO-AS52 и V79 на клетките на китайски хамстер и ТК6 на човешки лимфобластоидни клетки (1). В тези клетъчни линии най-често използваните генетични крайни точки измерват мутацията на киназата на тимидина (ТК) и трансферазата на хипоксантин-гуанин фосфорибозил (НРРТ), както и трансген от трансферазата на ксантин-гуанин фосфорибозил (ХРРТ). Тестовите за мутации на ТК, НРРТ и ХРРТ откриват различни спектри на генетични събития. Автозомното разполагане на ТК и ХРРТ може да даде възможност за откриването на генетични събития (напр. големи делеции), които не се забелязват на локуса на НРРТ върху X хромозоми (2)(3)(4)(5)(6).

В теста *in vitro* за клетъчни генни мутации при бозайници могат да се използват култури на установени клетъчни линии или клетъчни щамове. Клетките се избират въз основа на способността за растеж в дадена култура и устойчивостта в честотата на спонтанните мутации.

Тестовите *in vitro* по принцип изискват екзогенен източник на метаболитна активация. Тази система за метаболитна активация не може изцяло да имитира условията *in vivo* при бозайниците. Следва да се избягват условия, които биха довели до резултати, неотразяващи присъща мутагенност. Положителни резултати, които не отразяват присъща мутагенност, могат да възникнат от промени в рН, осмотично налягане или високи нива на цитотоксичност (7).

Настоящият тест се използва за откриване на евентуални мутагени и канцерогени. Много съединения, които са положителни в настоящия тест, са канцерогени за бозайници; все пак няма идеално съответствие между настоящия тест и канцерогенността. Съответствието зависи от химичния клас, а има все повече доказателства за това, че съществуват канцерогени, които не се откриват чрез настоящия тест, защото вероятно те действат чрез други, негенотоксични механизми или механизми, отсъстващи в бактериалните клетки(6).

Вижте също Общо въведение, част Б.

1.2. ДЕФИНИЦИИ

Мутация в поколението напред: генна мутация от родителския тип на мутанта, от който възниква изменение или загуба на ензимна активност на функцията на кодиращия протеин.

Мутагени — заместители на основна двойка: вещества, които причиняват заместване на една или няколко основни двойки в ДНК.

Фреймшифт мутагени: вещества, които причиняват добавяне или делеция на една или много основни двойки в ДНК молекула.

▼ B

Време на фенотипно изразяване: период, през който непроменените генни продукти са изчерпани от новомутиралите клетки.

Мутантна честота: броят на наблюдаваните мутантни клетки, разделен на броя на жизнеспособните клетки.

Относителен общ растеж: увеличение в броя на клетките за период време в сравнение контролна популация клетки; изчислен като продукта от суспензионния растеж спрямо в отрицателната контрола, умножен по ефективността (к.п.д.) на клониране спрямо отрицателна контрола.

Относителен суспензионен растеж: увеличение в броя на клетките за период на изразяване спрямо отрицателната контрола.

Жизнеспособност: ефективността на клониране на третираните клетки по време на посяването в блюдо в селективни условия след периода на изразяване.

Оцеляване: ефективността на клониране на третираните клетки, когато са посети в блюдо в края на периода на третиране; оцеляването обикновено се изразява по отношение на оцеляването в контролната клетъчна популация.

1.2. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ТЕСТА

Клетките с дефицит от тимидин киназа (ТК) поради мутацията $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ са устойчиви на цитотоксичните ефекти на пиримидиновия аналог трифлуоротимидин (ТФТ). Клетките с избыток от тимидин киназа са чувствителни към ТФТ, което причинява инхибиране на клетъчния метаболизъм и спира по-нататъшното клетъчно деление. Така мутантните клетки са способни да пролиферират в присъствието на ТФТ, докато нормални клетки, съдържащи тимидин киназа, не са. Аналогично, клетките с дефицит от HPRT или XPRT се избират според устойчивостта им към 6-тиогуанин (ТГ) или 8-азагуанин (АС). Следва внимателно да се подходи към свойствата на тестваното вещество, ако базов аналог или съединение се тестват в някой от тестовите за клетъчни генни мутации при бозайници. Например, следва всяка съмнителна селективна токсичност, предизвикана от тестваното вещество за мутантни или немутантни клетки, да бъде проучена. Следователно характеристиките на селекционната система/агент следва да се потвърдят, когато се тестват химикали, структурно свързани със селективния агент (8).

Клетки в суспензия или еднослойна култура се излагат на тестваното вещество, със и без метаболитна активация, за подходящ период от време и се субкултивират, за да се определи цитотоксичността и да се даде възможност за фенотипно изразяване преди селекцията на мутанти (9) (10) (11) (12) (13). Цитотоксичността обикновено се определя чрез измерване на относителната ефективност на клониране (оцеляване) или относителния общ растеж на културите след периода на третиране. Третираните култури се поддържат в среда на растеж за достатъчен период от време, характерен за всеки избран локус и клетъчен тип, за да се осигури почти оптимално фенотипно изразяване на индицираните мутации. Мутантната честота се определя чрез посяване на известни количества клетки в среда, съдържаща селективния агент, за да се открият мутантни клетки, и в среда без селективен агент, за да се определи ефективността на клониране (оцеляване). След подходящ инкубационен период колонии се преброяват. Мутантната честота се получава от броя на мутантни колонии в селективна среда и броя на колонии в неселективна среда.

▼B

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ТЕСТА

1.4.1. **Подготовка**1.4.1.1. *Клетки*

За настоящия тест има в наличност разнообразни клетъчни типове, включително и субклони на L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 или TK6 клетки. Типовете клетки, използвани в настоящия тест, следва да са показали чувствителност към химични мутагени, висока ефективност на клониране и стабилна честота на спонтанни мутации. Клетките следва да се проверят за замърсяване на микоплазмата и ако са замърсени, не следва да се използват.

Тестът следва да се провежда с предварително определени чувствителност и енергия. Броят клетки, култури и концентрации на тестваното вещество следва да отразяват тези дефинирани параметри (14). Минималният брой жизнеспособни клетки, оцеляващи от третирането и използвани на всеки етап на теста, следва да се базира на честотата на спонтанни мутации. Една принципна насока е да се използва брой клетки, който е равен най-малко на 10 пъти реципрочната стойност на честотата на спонтанни мутации. Все пак препоръчително е да се използват поне 10^6 клетки. Следва да има съответстващи данни от предишни изследвания за използваната клетъчна система, които да свидетелстват за последователност при провеждането на теста.

1.4.1.2. *Среда и условия за отглеждане на културите*

Следва да се използват подходяща хранителна среда и инкубационни условия (носител на културата, температура, концентрация на CO_2 и влажност на въздуха). Видовете хранителна среда следва да се подберат в съответствие със селективните системи и типа клетки на теста. Особено важно е условията за отглеждане на културите да се подберат така, че да осигуряват оптимален растеж на клетките по време на периода на изразяване и способност за образуване на колонии както за мутантни, така и за немутантни клетки.

1.4.1.3. *Приготвяне на културите*

Размножават се клетки от изходни култури, посяват се в хранителна среда и се инкубират при 37 °C. Преди употребата им в настоящия тест може да се окаже необходимо културите да се почистят от съществуващи преди това мутантни клетки.

1.4.1.4. *Метаболична активация*

Клетките следва да се експонират на тестваното вещество както в наличието, така и в отсъствието на подходяща система за метаболична активация. Най-често използваната система е постмитохондрична фракция (89) с добавка на кофактор, приготвена от черните дробове на гризачи, третирани с ензимно индуциращи реактиви, като Ароклор 1254 (15) (16) (17) (18) или смес от фенобарбитон и β -нафтофлавоон (19) (20).

Постмитохондричната фракция обикновено се използва с концентрации в обхвата от 1 — 10 % V/V в последната среда на теста. Изборът и състоянието на системата за метаболична активация може да зависи от класа на тествания химикал. В някои случаи би било подходящо да се използва повече от една концентрация на постмитохондрична фракция.

▼ B

Редица разработки, включително и създаването на генно конструирани клетъчни линии, изразяващи специфични активизиращи ензими, могат да осигурят потенциал за ендогенна активация. Изборът на клетъчни линии за теста следва да е научно обоснован (напр. чрез значението на изоензим цитохром P450 за метаболизма на тестваното вещество).

1.4.1.5. *Подготовка на тестваното вещество*

Твърдите вещества за теста следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители и, ако е необходимо, да се разреждат преди третиране на клетките. Течните вещества за теста могат да се добавят директно или да се разреждат преди третиране. Следва да се използват пресни препарати на тестваното вещество, освен ако данните за стабилността му не показват, че може да се съхранява.

1.4.2. **Условия за провеждане на теста**1.4.2.1. *Разтворител/носител*

Не следва да съществуват съмнения за химическа реакция на разтворителя/носителя с тестваното вещество и той следва да е съвместим с оцеляването на клетките и активността на S9. Ако се използват други освен добре познатите разтворители/носители, включването им в теста следва да се подкрепи от данни за съвместимостта им. Препоръчва се, винаги когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на воден разтворител/носител. При тестването на вещества, нестабилни във вода, използваните органични разтворители не следва да съдържат вода. Водата може да се отстрани чрез добавянето на молекулно сито.

1.4.2.2. *Концентрации на експозиция*

Изmeđu критериите, които следва да се имат предвид при определянето на най-високите концентрации, са цитотоксичността, разтворимостта в тестовата система и промените в рН или осмотичното налягане.

Цитотоксичността следва да се определи със и без метаболитна активация в главния експеримент, като се използва подходяща индикация на клетъчната цялост и растеж като относителна ефективност на клониране (оцеляване) или относителен общ растеж. Може би ще е полезно да се определи цитотоксичността и разтворимостта в предварителен експеримент.

Следва да се използват най-малко четири анализируеми концентрации. Там, където се среща цитотоксичност, тези концентрации следва да покриват обхват от максимална до слаба токсичност или липса на токсичност; това обикновено означава, че концентрациите следва да се различават с коефициент не повече от 2 до $\sqrt{10}$. Ако максималната концентрация е базирана на цитотоксичност, то резултатът следва да е приблизително 10—20 % (но не по-малко от 10 %) относително оцеляване (относителна ефективност на клониране) или относителен общ растеж. За относително нецитотоксични вещества, максималната тестова концентрация следва да е 5 mg/ml, 5 µl/ml, или 1,01 M, в зависимост от това коя е най-ниска.

▼B

Относително неразтворимите вещества следва да се тестват до или над границата им на разтворимост при условията на отглеждане на културата. Доказателствата за неразтворимост следва се определят в последната среда на третиране, на която са експонирани клетките. може да бъде да се определи разтворимостта в началото и края на третирането, тъй като тя може да се промени в течение на експонирането в тестваната система поради присъствието на клетки, 89, серум и др. Неразтворимостта може да се установи с просто око. Утайката не следва да пречи на отчитането.

1.4.2.3. *Контроли*

Паралелни положителни и отрицателни (разтворител или носител) контроли, както със, така и без метаболитна активация, следва да се включат във всеки експеримент. Когато се използва метаболитна активация, химикалът за положителните контроли следва да е от такъв вид, че да изисква активация, за да произведе мутагенна реакция.

Примерите за положителни контролни вещества включват:

Състояние на метаболитна активация	Локус	Вещество	CAS №	Einecs №
Отсъствие на екзогенна метаболитна активация	HPRT	Етил метансулфонат	62-50-0	200-536-7
		Етил нитрозокарбамид	759-73-9	212-072-2
	TK (малки и големи колонии)	Метил метансулфонат	66-27-3	200-625-0
		XPRT	Етил метансулфонат	62-50-0
	Етил нитрозокарбамид		759-73-9	212-072-2
	Наличие на екзогенна метаболитна активация	HPRT	3-метилхолантрен	56-49-5
]N-нитрозодиметиламин			62-75-9	200-549-8
7,12-диметилбензантрацен			57-97-6	200-359-5
TK (малки и големи колонии)		Циклофосфамид	50-18-0	200-015-4
		Циклофосфамид монохидрат	6055-19-2	
		Бензо[а]пирен	50-32-8	200-028-5
		3-метилхолантрен	56-49-5	200-276-5
XPRT		N-нитрозодиметиламин (за високи нива на S-9)	62-75-9	200-549-8
		Бензо[а]пирен	50-32-8	200-028-5

Могат да се използват други подходящи референтни вещества за положителни контроли, напр. ако една лаборатория има база данни от предишни изследвания за 5-бромо 2'-деоксиуридин (CAS № 59-14-3, EINECS № 200-415-9), това референтно вещество би могло също да се използва. Следва да се има предвид използването на химикали за положителна контрола, принадлежащи към химичен клас, когато такива са налични.

▼B

Следва да се включат отрицателните контроли, състоящи се само от разтворител или носител в средата за третиране и третиране по същия начин както опитните групи. В допълнение към това следва също да се използват нетретирани контроли, освен ако няма контролни данни от предишни изследвания, показващи, че избраният разтворител не причинява делеционни или мутагенни ефекти.

1.4.3. Процедура

1.4.3.1. *Третиране с тестваното вещество*

Пролифериращи клетки се експонират на въздействието на тестваното вещество както със, така и без метаболитна активация. Експозицията следва да е за подходящ период от време (обикновено 3—6 часа е ефективният период). Времето на експозиция може да обхване един или повече клетъчни цикли.

За всяка тествана концентрация може да се използват две или една третирана култура. Когато се използва по една култура, броят на концентрациите следва да се увеличи, за да се осигури адекватен брой култури за анализ (напр. най-малко осем анализируеми концентрации). Отрицателните (разтворител) контролни култури следва да са две.

Газообразните или летливи вещества следва да се тестват чрез подходящи методи, като например в запечатани носители на културата (21) (22).

1.4.3.2. *Измерване на оцеляването, жизнеспособността и честотата на мутантите*

В края на периода на експозиция клетките се промиват и култивират, за да се определи оцеляването и да се даде възможност за изразяване на мутантния фенотип. Измерването на цитотоксичността чрез определяне на относителната ефективност на клониране (оцеляване) или относителния общ растеж на културите обикновено започва след периода на третиране.

Всеки локус изисква точно определено минимално време за почти оптимално изразяване на фенотипа на новоиндуцираните мутанти (HPRT и XPRT изискват поне 6—8 дни, а ТК — поне два дни). Клетките се отглеждат в среда със и без селективен(и) агент(и) за определяне на бройките мутанти и съответно на ефективността на клониране. Измерването на жизнеспособността (използвано за изчисляване на честотата на мутантите) започва в края на времето на изразяване чрез култивиране в блюдо в неселективна среда.

Ако тестваното вещество е положително в теста L5178Y TK^{+/−}, сортирането на колонии следва да се извърши поне на една от тестваните култури (най-високата положителна концентрация) и на отрицателните и положителните контроли. Ако тестваното вещество е отрицателно в теста L5178Y TK^{+/−}, сортирането на колонии следва да се извърши на отрицателните и положителните контроли. В изследвания, използващи ТК6TK^{+/−}, може също да се направи сортиране на колонии.

▼B**2. ДАННИ****2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Данните следва да обхващат цитотоксичността и жизнеспособността, броя на колонии и честотите на мутантите за третираните и контролни култури. В случай на положителна реакция в теста L5178Y ТК^{+/-} колонии се отчитат, като се използват критериите за малки и големи колонии при поне една концентрация на тестваното вещество (най-високата положителна концентрация) и на отрицателните и положителните контроли. Молекулното и цитогенетичното естество на мутантите както от големите, така и от малките колонии е изследвано в детайли (23) (24). В теста ТК^{+/-} колонии се отчитат с помощта на критериите за колонии с нормален растеж (големи) и бавен растеж (малки) (25). Мутантните клетки, претърпели най-обширното генетично увреждане, имат удължени времена за удвояване и поради това образуват малки колонии. Това увреждане типично варира по мащаб от загубите на целия ген до кариотипно видими хромозомни аберации. Индуцирането на мутанти на малки колонии се свързва с химикали, индуциращи едри хромозомни аберации (26). По-малко засегнатите мутантни клетки растат с темпове, подобни на тези на родителските клетки и формират големи колонии.

Следва да се посочи оцеляването (относителни ефективности на клониране) или относителният общ растеж. Честотата на мутантите следва да се изрази като брой на мутиралите клетки спрямо броя на оцеляващите клетки.

Посочват се данните за отделните култури. Освен това всички данни се резюмират в таблица.

Няма изискване за потвърждаване на ясна положителна реакция. Двухазните резултати следва да се изяснят чрез допълнително тестване, като за предпочитане е да бъдат изменени условията на извършване на опита. Отрицателните резултати следва да се потвърдят за всеки случай поотделно. В случаите, когато не се смята необходимо потвърждаването на отрицателни резултати, следва да се даде обосновка. Няма изискване за потвърждаване на ясна положителна реакция. Следва да се предвиди изменение в параметрите на изследване, за да се разширят условията, при които се прави оценка, при последващи опити или двухазните или отрицателните резултати. Параметрите на изследването, които биха могли да се изменят, обхващат границите на концентрацията и условията на метаболитна активация.

2.2. ОЦЕНКА И ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Има няколко критерия за определяне на положителен резултат, като например увеличение, свързано с концентрацията, или репродуцируемо увеличение на честотата на мутантите. Първо следва да се разгледа биологичната значимост на резултатите. При оценката на резултатите от теста биха могли да се използват статистически методи. Статистическата значимост не следва да е единственият решаващ фактор за положителна реакция.

Тествано вещество, за което резултатите не удовлетворяват горните критерии, се счита немутагенно в настоящата система.

▼B

Въпреки че повечето опити дават ясно положителни или отрицателни резултати, в редки случаи наборът данни изключва правенето на категорична преценка за активността на тестваното вещество. Резултатите могат да останат двузначни или под въпрос, независимо от това колко пъти е повторен опитът.

Положителните резултати от теста *in vitro* за клетъчни генни мутации при бозайници показват, че тестваното вещество индуцира генни мутации в използваните в теста култивирани клетки на бозайници. Най-значима е положителната реакция на концентрация, която е репродуцируема. Отрицателните резултати показват, че при условията на теста тестваното вещество не предизвиква генни мутации в използваните в теста култивирани клетки на бозайници.

3. **ДОКЛАДВАНЕ****ДОКЛАД ЗА ТЕСТА**

Докладът за теста следва да включва следната информация:

Разтворител/носител:

- обосновка за избора на носител,
- разтворимост и стабилност на тестваното вещество в разтворител/носител, ако са известни.

Клетки:

- тип и източник на клетки,
- брой клетъчни култури,
- брой клетъчни пасажи, ако е приложим,
- методи за поддържане на клетъчна култура, ако е приложимо,
- отсъствие на микоплазма.

Условия за провеждане на теста:

- основна причина за избора на концентрации и броя на култури, в т.ч. напр. данни за цитотоксичността и граници на разтворимост, ако са налични,
- състав на средите, CO₂ концентрация,
- концентрация на тестваното вещество,
- обем на носителя и добавеното тествано вещество,
- температура на инкубация,
- време на инкубация,
- времетраене на третирането,
- гъстота на клетките по време на третиране,
- тип и състав на системата за метаболитна активация, в т.ч. критерии за приемливост,
- положителни и отрицателни контроли,

▼B

- продължителност на периода на изразяване (в т.ч. брой на посетите клетки и субкултури и графици на подхранване, ако са уместни),
- селективни агенти,
- критерии за приемане на тестовете за положителни, отрицателни или двузначни,
- използвани методи за преброяване на жизнеспособните и мутиралите клетки,
- кои дефиниции за размера и типа на колонии са взети предвид (в т.ч. критерии за „малки“ и „големи“ колонии, както е уместно).

Резултати:

- признаци на токсичност,
- признаци на утаяване,
- данни за рН и осмотичното налягане по време на експозицията към тестваното вещество, ако са определени,
- размер на колонии, ако са отчетени поне за отрицателни и положителни контроли,
- адекватност на лабораторията за откриване на мутанти от малки колонии със системата L5178Y TK^{+/−}, когато е уместно,
- взаимоотношение доза-реакция, където е възможно,
- статистически анализи, ако има такива,
- паралелни отрицателни (разтворител/носител) и положителни контролни данни,
- отрицателни (разтворител/носител) и положителни контролни данни от предишни изследвания с обхвати, средни стойности и стандартни отклонения,
- честота на мутантите.

Обсъждане на резултатите.

Заключения.

4.

ПРЕПРАТКИ

- (1) Moore, M. M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindal, K. R. (eds.) (1987), *Banbury Report 28; Mammalian Cell Mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (2) Chu, E. Y. and Malling H. V. (1968), *Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells In Vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61, pp. 1306—1312.
- (3) Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), *Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts*, *Mutation Res.* 94, pp. 467—485.
- (4) Moore, M. M., Harington-Brock, K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), *Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci*, *Mutagenesis*, 4, pp. 394—403.

▼B

- (5) Aaron, C. S., and Stankowski, Jr. L. F., (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT AssayS: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res.* 223, pp. 121—128.
- (6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.* 312, pp. 235—239.
- (7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.* 257, pp. 147—204.
- (8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 115, pp. 225—251.
- (9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protections Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 196, pp. 17—36.
- (10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., ÓNeill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 135—141.
- (11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.*, 216, pp. 9—17.
- (12) Stankowski, L. F. Jr., Tindal, K. R., and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191 Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.*, 160, pp. 133—147.
- (13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedure for the L5178Y/TK⁺ — TK⁺ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, w: Kilbey, B. J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239—268.
- (14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith S. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, w: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., ed., Cambirdge University Press, pp. 66—101.
- (15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzacoro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome- Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.* 46, pp. 365—373.
- (16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.* 31, pp. 347—364.

▼B

- (17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK^{+/−} — Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat. Res.* 59, pp. 61—108.
- (18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.* 113, pp. 173—215.
- (19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in: *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis* 7, pp. 175—177.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85—88.
- (21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Ticc, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91—103.
- (22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795—801.
- (23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, pp. 51—55.
- (24) Moore, M. M., Clive, D. Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine, Resistant (TFT⁺) Mutants of L5178Y/TK^{+/−} — Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.* 151, pp. 161—174.
- (25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.* 229, pp. 89—102.
- (26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK^{+/−} - 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis*, 5, pp. 609—614.

▼M7

▼B**Б.21. ИЗПИТВАНЯ *IN VITRO* ЗА ТРАНСФОРМАЦИИ В КЛЕТКИ ОТ БОЗАЙНИЦИ****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Вижте Общо въведение част Б.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Вижте Общо въведение част Б.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

За откриване на фенотипни изменения *in vitro*, предизвикани от химични вещества, свързани с *in vivo* злокачествена трансформация, могат да бъдат използвани системи за култивиране на клетки от бозайници. Често използваните клетки са СЗН10Т_{1/2}, 3Т3, SHE, плъх на Fisher и при изпитванията се разчита на измененията в клетъчната морфология, образуването на огнища и закрепването в полутвърд агар. Съществуват порядко използвани системи, които откриват други физиологични и морфологични изменения в клетките след експозиция на канцерогенни химически вещества. Някои от изпитваните *in vitro* крайни точки няма установена механистична връзка с рака. Някои от изпитваните системи могат да долавят туморни промотори. Клетъчната токсичност може да се определя чрез измерване на ефекта на изпитвания материал върху способността за образуване на колонии (ефективност на клониране) или скоростта на растеж на културите. За да се измери клетъчната токсичност, трябва да се установи дали експозицията на изпитваното химическо вещество е свързано с токсикологични ефекти, но не може да се използва за изчисляване на честотата на трансформациите при всички изпитвания, защото някои могат да включват продължително инкубиране и/или повторно посяване/пресяване.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ*Подготовка***Клетки**

В зависимост от използваното трансформационно изпитване съществуват разнообразни клетъчни линии или първични клетки. Изследвателят трябва да бъде сигурен, че всички клетки при провежданото изпитване демонстрират подходящи фенотипни изменения след експозиция на известни канцерогени и че изпитването в лабораторията на изследвателя е с доказана и документирана валидност и надеждност.

Среда

Трябва да е използват среди и експериментални условия, които са подходящи за използваното трансформационно изпитване.

▼B**Изпитвано вещество**

Изпитваните вещества могат да бъдат приготвени в средите за култивиране или да бъдат разтворени или суспендирани в подходящи носители преди третирането на клетките. Крайната концентрация на носителя в системата за култивиране не трябва да оказва влияние върху жизнеспособността, скоростта на растеж на клетките или честотата на трансформациите.

Метаболитно активиране

Клетките трябва да бъдат подложени на експозиция на изпитваното вещество както в присъствие, така и в отсъствие на подходяща система за метаболитно активиране. Алтернативно, когато се използват клетки, които притежават вътрешна метаболитна активност, трябва да бъде известно, че естеството на активността е подходящо за изпитвания клас химически вещества.

*Условия на изпитване***Използване на отрицателни и положителни контроли**

Във всеки експеримент трябва да бъдат включени положителни контроли, като се използва както пряко действащо съединение, така и съединение, което изисква метаболитно активиране. Трябва да се използват и отрицателни контроли (за носителя).

Следват примери за вещества, които могат да бъдат използвани като положителни контроли:

— Пряко действащи химически вещества:

— етилметансулфонат,

— β -пропиолактон,

— Съединения, изискващи метаболитно активиране:

— 2-ацетиламинофлуорен,

— 4-диметиламиноазобензен,

— 7,12-диметилбензантрацен.

Когато е целесъобразно, трябва да се включи допълнителна положителна контрола със същия химически клас, както изпитваното съединение.

Експозиционни концентрации

Трябва да се използват няколко концентрации на изпитваното вещество. Тези концентрации трябва да предизвикат токсичен ефект, свързан с концентрацията, като най-високата концентрация води до ниско ниво на преживяемост, а преживяемостта при най-ниската концентрация е приблизително същата, както при отрицателната контрола. Относително неразтворимите във вода вещества трябва да се изпитват до границата на разтворимостта им, като се използват подходящи процедури. За лесно разтворимите във вода нетоксични вещества високата изпитвана концентрация трябва да се определя за всеки конкретен случай.

▼B*Процедура*

Клетките трябва да бъдат подложени на експозиция с подходяща продължителност в зависимост от използваната експериментална система, а това може да включва повторно дозиране, придружено с промяна на средата (и, ако е необходимо, прясна смес за метаболитно активиране), ако експозицията е продължителна. Клетките без достатъчна вътрешна метаболитна активност трябва да бъдат подложени на експозиция на изпитваното вещество както в присъствие, така и в отсъствие на подходяща система за метаболитно активиране. В края на експозицията клетките се промиват напълно от изпитваното вещество и се култивират при условия, които са подходящи за появата на трансформирания фенотип, който се мониторира, и се определя честотата на трансформацията. Всички резултати се потвърждават в независим експеримент.

2. ДАННИ

Данните следва да бъдат представени в табличен вид и могат да бъдат в различна форма според използваното изпитване, например брой на петриевите панички, положителни петриеви панички или брой на трансформираните клетки. Когато е целесъобразно, преживяемостта следва да се изрази като процент от контролните нива, а честотата на трансформации да се изрази за брой преживели клетки. Данните следва да бъдат оценени с помощта на подходящи статистически методи.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Ако е възможно, протоколът от изпитването съдържа следната информация:

- използван тип клетки, брой на клетъчните култури, методи за поддържане на клетъчните култури,
- условия на изпитване, концентрация на изпитваното вещество, използван носител, времето на инкубиране, продължителност и честота на третирането, плътност на клетките по време на третирането, тип на използваната екзогенна система за метаболитно активиране, положителни и отрицателни контролни групи, спецификация на мониторирания фенотип, използвана селективна система (ако е необходимо), обосновка за избор на дозата,
- използван метод за пресмятане броя на жизнеспособните и трансформираните клетки,
- статистическа оценка,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретиране на резултатите,

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ

Вижте Общо въведение, част Б.

4. ПОЗОВАВАНИЯ

Вижте Общо въведение, част Б.

▼B**Б.22. ИЗПИТВАНЕ ЗА ДОМИНАНТНА ЛЕТАЛНОСТ ПРИ ГРИЗАЧИ****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Вижте Общо въведение, част Б.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Вижте Общо въведение, част Б.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Доминантната леталност предизвиква ембрионална или фетална смърт. Предизвикването на доминантна леталност чрез контакт с химично вещество показва, че веществото е оказало влияние върху зародишната тъкан на изпитвания вид. Общоприето е, че доминантната леталност се дължи на увреждане на хромозомите (структурни или бройни аномалии). Ембрионалната смърт, ако женските индивиди са третираны, може да бъде и в резултат на токсични ефекти.

Обикновено мъжките животни се подлагат на експозиция на изпитваното съединение и се чифтосват с нетретирани девствени женски индивиди. Различните стадии на развитието на зародишните клетки могат да бъдат изпитвани поотделно с помощта на последователни чифтосвания. Нарастването на броя на мъртвите имплантирани зародиши за женски индивид в третираната група в сравнение с броя на мъртвите имплантирани зародиши за женски индивид в контролната група отразява постимплантационната загуба. Предимплантационната загуба може да бъде оценена въз основа на броя на жълтите тела или чрез сравняване на общия брой имплантирани зародиши за женски индивид в третираната и контролната група. Общата доминантна леталност представлява сумата от пред- и постимплантационната загуба. Изчисляването на общата доминантна леталност става чрез сравняване на броя живи имплантирани зародиши за женски индивид в експерименталната група и броя на живите имплантирани зародиши за женски индивид в контролната група. Намаляването на броя на имплантираните зародиши през определени интервали може да се дължи на убиване на клетки (т.е. на сперматоцити и/или сперматоонии).

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ*Подготовка*

Когато е възможно, изпитваните вещества следва да бъдат разтворени или суспендирани в изотоничен физиологичен разтвор. Неразтворимите във вода химически вещества могат да бъдат разтворени или суспендирани в подходящи носители. Използваният носител не следва да оказва влияние върху изпитваното химическо вещество, нито да предизвиква токсични ефекти. Следва да се използват пряко приготвени препарати от изпитваните химически вещества.

▼B*Условия на изпитване*

Начин на прилагане

Обикновено изпитваното съединение следва да се приложи еднократно. Въз основа на токсикологичната информация може да се използва схема за многократно третиране. Обичайните начини на прилагане са чрез орално интубиране или интраперитонеално инжектиране. Може да са целесъобразни други начини на прилагане.

Експериментални животни

Като експериментални видове се препоръчват плъхове или мишки. Здрави, напълно полово съзрели животни се избират по случаен признак и се разпределят в третирана и контролна група.

Брой и пол

Следва да се използва адекватен брой третирани мъжки индивиди, като се вземат предвид спонтанните колебания в оценяваната биологична характеристика. Избраният брой следва да се базира на предварително определената чувствителност на откриването и възможностите. Например при типично изпитване броят на мъжките индивиди във всяка дозирана група следва да бъде достатъчен, за да се осигурят между 30 и 50 бременни женски индивиди за чифтосване.

Използване на отрицателни и положителни контроли

Обикновено във всеки експеримент следва да се включат паралелни положителни и отрицателни (за носителя) контроли. Когато съществуват приемливи положителни контролни резултати от наскоро проведени в същата лаборатория експерименти, тези резултати могат да бъдат използвани вместо паралелна положителна контрола. Положителните контролни вещества следва да се използват при подходяща ниска доза (например метил метансулфонат (MMS) интраперитонеално в доза 10 mg/kg), за да се демонстрира чувствителността на изпитването.

Нива на дозиране

Нормално следва да се използват три нива на дозиране. Високата доза следва да предизвиква признаци на токсичност или намалена плодовитост при третирани животни. В определени случаи може да е достатъчно едно-единствено ниво на дозиране.

Гранично изпитване

Нетоксичните вещества следва да бъдат изпитвани при 5 g/kg при еднократно прилагане и при 1 g/kg на ден при многократно прилагане.

Процедура

Съществуват няколко схеми за третиране. Най-широко се прилага еднократното прилагане на изпитваното вещество. Могат да се използват други схеми за третиране.

Отделните мъжки индивиди се чифтосват последователно с едно или две нетретирани девствени женски животни на подходящи интервали след третирането. Женските индивиди следва да бъдат оставени с мъжките животни в продължение поне на един цикъл на разгонване или докато се осъществи чифтосване, което се определя по наличието на сперма във влагалището или на вагинална запушалка.

▼ B

Броят на чифтосванията след третирането зависи от схемата на третиране и следва да осигури вземане на проби от всички стадии на развитие на зародишните клетки.

Женските индивиди се пожегтват през втората половина на бременността и съдържанието на матката се изследва, за да се определи броят на мъртвите и живите имплантирани зародиши. Могат да се изследват яйчниците, за да се определи броят на жълтите тела.

2. ДАННИ

Данните следва да бъдат представени в табличен вид, за да покажат броя на мъжките индивиди, броя на бременните женски и броя на женските животни, които не са бременни. Поотделно следва да се отчетат резултатите от всяко чифтосване, включително идентичността на всеки мъжки и женски индивид. За всеки женски индивид следва да се регистрират седмицата на чифтосването, нивото на дозиране, получено от мъжките, честотата на живите имплантирани зародиши и на мъртвите имплантирани зародиши.

Изчисляването на общата доминантна леталност се базира на сравняване на броя живи имплантирани зародиши за женски индивид в експерименталната група към броя на живите имплантирани зародиши за женски индивид в контролната група. Анализира се съотношението на живите към мъртвите имплантирани зародиши от третираната група, сравнено със същото съотношение от контролната група, за да се отбележи постимплантационната загуба.

Данните се регистрират като ранни и късни смъртни случаи, като от таблиците това следва да става ясно. Ако се оценява предимплантационната загуба, тя следва да бъде съобщена. Предимплантационната загуба може да бъде изчислена като несъответствие между броя на жълтите тела и броя на имплантираните зародиши или като намаляване на средния брой имплантирани зародиши за матка в сравнение с контролните чифтосвания.

Данните се оценяват с помощта на подходящи статистически методи.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Ако е възможно, протоколът от изпитването съдържа следната информация:

- вид, порода, възраст и тегло на използваните животни, броя на животните от всеки пол в експерименталната и контролната група,
- изпитваното вещество, носителя, изследваните нива на дозиране и обосновката за избор на доза, отрицателните и положителните контроли, данните за токсичността,
- начина и схемата на третиране,
- схемата на чифтосване,
- използвания метод за определяне дали е осъществено чифтосване,
- времето на пожегване,
- критериите за отчитане на доминантната леталност,
- когато е необходимо, връзката доза/отговор,

▼B

- статистическа оценка,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретиране на резултатите,

3.2. **ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ**

Вижте Общо въведение, част Б.

4. **ПРЕПРАТКИ**

Вижте Общо въведение, част Б.

▼B**Б.23. ТЕСТ ЗА СПЕРМАТОГОНИАЛНИ ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ ПРИ БОЗАЙНИЦИ****1. МЕТОД**

Настоящият метод е изцяло подобен на теста за сперматогониални хромозомни аберации при бозайници на OECD TG 483 от 1997 г.

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Целта на теста *in vivo* за сперматогониални хромозомни аберации при бозайници е да се идентифицират веществата, причиняващи структурни хромозомни аберации в сперматогониалните клетки на бозайници (1) (2) (3) (4) (5). Структурните аберации могат да бъдат два типа: хромозомни и хроматидни. При повечето химични мутагени индуцираните аберации са от хроматиден тип, но се срещат също и аберации от хромозомен тип. Настоящият метод не е предназначен да измерва геномни аберации и не се използва обикновено за тази цел. Хромозомните мутации и свързаните с тях събития са причината за много генетични болести при човека

Настоящият тест измерва хромозомните събития в сперматогониалните зародишни клетки и следователно от него се очаква да предсказва индуцирането на унаследяеми мутации в зародишни клетки.

В настоящия тест се използват обикновено гризачи. Този цитогенетичен тест *in vivo* открива хромозомни аберации в сперматогониални митози. Други прицелни клетки на са обект на настоящия метод.

За да се открият аберации от хроматиден тип в сперматогониални клетки, следва да се изследва първото митотично клетъчно деление след третиране. преди тези увреждания да се загубят в следващите клетъчни деления. Допълнителна информация от третирани сперматогониални стволови клетки може да се получи чрез мейотичен хромозомен анализ за аберации от хромозомен тип на диакинезисна метафаза I, когато третираниите клетки стават сперматоцити.

Настоящият тест *in vivo* е предназначен да изследва дали мутагените на соматични клетки са също така активни в зародишни клетки. Освен това сперматогониалният тест е от значение за оценката на опасността от това, че позволява разглеждането на фактори като *in vivo* метаболизма, фармакокинетиката и процесите на ДНК репарация.

В тестиса съществува редица генерации сперматогони със спектър на чувствителност към химично третиране. Следователно откритите аберации представляват съвкупна реакция на третираниите популации сперматогониални клетки, като преобладаващи са по-многобройните диференцирани сперматогониални клетки. В зависимост от положението им в границите на тестиса различните генерации сперматогони биха могли или не да бъдат експонирани на общото кръвообращение поради физическата и физиологичната клетъчна бариера на Сертоли и бариерата кръв-тестис.

Ако има доказателства, че тестисното вещество или реактивен метаболит няма да достигне до прицелната тъкан, не е подходящо да се използва настоящият тест.

Вижте също Общо въведение, част Б.

▼ B

1.2. ДЕФИНИЦИИ

Хроматиден тип аберация: структурно увреждане на хромозомата, изразяващо се в скъсване на единични хроматиди или скъсване и повторно съединяване между хроматиди.

Хромозомен тип аберация: структурно увреждане на хромозомата, изразяващо се в скъсване или скъсване и повторно съединяване на двата хроматид на една и съща страна.

Празнина: ахроматично увреждане, по-малко от ширината на един хроматид с минимално отклонение в реда на хроматид(ите).

Геномна аберация: промяна в броя на хромозоми в сравнение с нормалния брой, характерен за използваните животни.

Полиплоидия: множество на хаплоидния брой хромозоми (n), различно от диплоидния брой (т.е. $3n$, $4n$ и т.н.).

Структурна аберация: промяна в хромозомната структура, откриваема чрез наблюдение с микроскоп на етапа на метафаза на клетъчното деление, наблюдавана като делеции и фрагменти, вътрешнохромозомни или междухромозомни промени.

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ТЕСТА

Животни се експонират на тестваното вещество по подходящ начин и се убиват в подходящи моменти след третирането. Преди убиването животните се третират с блокиращ метафазата агент (напр. колхицин или Колцеמיד®). След това се приготвя хромозомен препарат от клетки на зародиш, оцветява се и клетките в метафаза се анализират за хромозомни аберации.

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ТЕСТА

1.4.1. Подготовка

1.4.1.1. Подбор на животинския вид

Мъжките китайски хамстери и мишки са общо използваните. Обаче мъжки индивиди от друг подходящ вид бозайници също биха могли да се използват. За теста следва да се вземат общо използваните лабораторни щамове на млади, здрави, пораснали животни. В началото на изследването вариациите в теллото на животните следва да са минимални и да не превишават $\pm 20\%$ от средното телло.

1.4.1.2. Условия на отглеждане и хранене

Прилагат се общите условия в Общото въведение към част Б, въпреки че целта е влажността на въздуха да е 50—60 %.

1.4.1.3. Подготовка на животните

Здрави, млади, пораснали животни от мъжки пол се отделят на произволен принцип за контролните и опитните групи. Клетките следва да се подредят така, че да се намалят до минимум евентуалните ефекти от разполагането им. На животните се дава уникална идентификация. Животните се аклиматизират към лабораторните условия поне пет дни преди началото на изследването.

▼B1.4.1.4. *Приготвяне на дози*

Твърдите вещества за теста следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители и, ако следва, да се разреждат преди даване на дозата на животните. Течните вещества за теста могат да се дават директно или да се разреждат преди дозиране. Следва да се използват пресни препарати на тестваното вещество, освен ако данните за стабилността му не показват, че може да се съхранява.

1.4.2. **Условия за провеждане на теста**1.4.2.1. *Разтворител/носител*

Разтворителят/носител не следва да има токсично въздействие с използваните нива на дозиране, а също така не следва да има съмнения за химическа реакция между него и тестваното вещество. Ако се използват други, освен добре познатите разтворители/носители, включването им в теста следва да се подкрепи от данни за съвместимостта им. Препоръчва се, винаги когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на воден разтворител/носител.

1.4.2.2. *Контроли*

Във всеки тест следва да се включват паралелни положителни и отрицателни (разтворител/носител) контроли. Като се изключи третирането с тестваното вещество, с животните в контролните групи следва да се борави по един и същи начин както с животните от опитните групи.

Положителните контроли следва да произвеждат структурни хромозомни аберации *in vivo* в сперматогониални клетки, когато се администрират при нива на експозиция, при които се очаква да се постигне забележимо увеличение спрямо фона.

Положителните контролни дози следва да са така избрани, че ефектите да са ясни, но да не разкриват непосредствено на четеца идентичността на кодираните предметни стъкла. Приемливо е положителните контроли да се администрират по различен начин от тестваното вещество и да им се взема проба само еднократно. Освен това за положителна контрола следва да се разглежда използването на химикали, принадлежащи към химичен клас, когато такива са налични. Примерите за положителни контролни вещества включват:

Вещество	CAS №	EINECS №
циклофосфамид	50-18-0	200-015-4
циклофосфамид монохидрат	6055-19-2	
Циклохексамин	108-91-8	203-629-0
Митомицин С	50-07-7	200-008-6
Акриламид мономер	79-06-1	201-173-7
Триетиленмеламин	51-18-3	200-083-5

За всяко вземане на проби следва да се включват отрицателните контроли, третирани само с разтворител или носител, а за всичко останало третирани както опитните групи, освен ако няма приемлива изменчивост между животните и честотите на клетки хромозомни аберации са доказани с исторически контролни данни от предишни изследвания. Освен това следва също да се използват нетретирани контроли, освен ако няма данни от предишни контролни изследвания или публикувани контролни данни, показващи, че няма никакви делеционни или мутагенни ефекти, индуцирани от избрания разтворител/носител.

▼B

1.5. ПРОЦЕДУРА

1.5.1. **Брой на животните**

Всяка опитна и контролна група следва да включва най-малко пет анализируеми мъжки животни.

1.5.2. **График на третиране**

За предпочитане е тестваните вещества да се администрират веднъж или два пъти (т.е. като едно или две третириания). Тестваните вещества могат също да се администрират като разделена доза, т.е. две третириания в един и същи ден, разделени от не повече от няколко часа, за да се улесни даването на голям обем материал. Други режими на дозиране следва да се обосноват научно.

В групата с най-висока доза проби се вземат два пъти след третирането. Тъй като кинетиката на клетъчния цикъл може да се повлияе от тестваното вещество, практикува се едно рано и едно късно вземане на проба около 24 и 48 часа след третирането. За дози, различни от най-високата, проба се взема на 24 часа или 1,5 пъти продължителността на клетъчния цикъл, освен ако не е известно друго време за вземане на проба, по-подходящо за откриване на ефектите (6).

Освен това могат да се използват други времена на вземане на проби. Например когато се използват химикали, които могат да индуцират хромозомно изоставане или могат да предизвикат S-независими ефекти, по-ранните периоди на вземане проби могат да бъдат по-подходящи (1).

Доколкото е уместно използването на повторен график на третиране следва да се идентифицира за всеки случай поотделно. След повторен график на третиране животните следва да бъдат убити 24 часа (1,5 пъти от продължителността на клетъчния цикъл) след последното третиране. При необходимост могат да се прилагат допълнителни периоди на вземане на проби.

Преди убиването животните се инжектират интраперитонеално с подходящо блокиращо метафазата вещество (напр. Колцемид® или колхицин). След това, след подходящ интервал, от животните се взема проба. За мишки този интервал е приблизително 3—5 часа, за китайски хамстери той е около 4—5 часа.

1.5.3. **Нива на дозиране**

Ако се извършва изследване за обхват, поради това че няма в наличност подходящи данни, то следва да се извърши в същата лаборатория, като се използват същият вид, щам, пол и режим на третиране както в главното изследване (7). Ако има токсичност, за първото вземане на проба се използват три нива на дозиране. Тези нива на дозиране следва да обхващат от максимална до слаба или липса на токсичност. При вземане на проба на по-късен етап следва да се прилага само най-високата доза. Най-високата доза се дефинира като доза, създаваща признаци на такава токсичност, че по-високи нива на дозиране, базирани на същия режим, би могло да се очаква да доведат до леталност.

▼B

Вещества със специфични биологични активности при ниски, нетоксични дози (като хормони и митогени) могат да бъдат изключения за критериите за определяне на дозата и следва да се оценяват за всеки конкретен случай. Най-високата доза може също да се дефинира като доза, която показва известни признаци на токсичност в сперматогониалните клетки (напр. намаляване на съотношението на сперматогониални митози спрямо първата и втората метафаза на клетъчното деление; това намаляване не следва да надвишава 50 %).

1.5.4. Граничен тест

Ако тест с едно ниво на дозиране от минимум 2 000 mg/kg телесно тегло/ден при еднократно третиране или две третиране в един и същи ден не дава забележими токсични ефекти, а генотоксичност не би могла да се очаква на базата на данни от структурно свързани вещества, то тогава пълно изследване с три нива на дозиране може да не се счита за необходимо. Очакваната експозиция на хора може да покаже, че е необходимо в граничния тест да се използва по-високо ниво на дозиране.

1.5.5. Администриране на дозите

Тестваното вещество обикновено се дава със стомашна сонда, като се използва тръба или подходяща интубационна канюла, или чрез интраперитонеална инжекция. Други начини на експозиция са приемливи, ако могат да бъдат обосновани. Максималният обем течност, който може да се вкара еднократно със стомашна сонда или инжекция, зависи от големината на опитното животно. Обемът не следва да превишава 2 ml/100 g телесно тегло. Обеми, по-високите от тези, следва да се обосноват. С изключение на дразнещи или корозивни вещества, които нормално дават изострящи ефекти при повисоки концентрации, променливостта на тестовия обем следва да се сведе до минимум чрез регулиране на концентрацията с цел осигуряване на постоянен обем на всички нива на дозиране.

1.5.6. Подготовка на хромозомите

Незабавно след убиване на животните от един или двата тестиса се приготвят клетъчни суспензии, експонират се на хипотоничен разтвор и се фиксират. Клетките се разнасят по предметни стъкла и се оцветяват.

1.5.7. Анализ

За всяко животно следва да се анализират най-малко 100 добре разнесени метафази (т.е. минимум 500 метафази на група). Този брой може да се намали, когато се наблюдават голям брой аберации. Всички предметни стъкла, включително и тези на положителни и отрицателни контроли, следва да се кодират независимо едно от друго преди микроскопския анализ. Тъй като процедурите по фиксиране водят до разкъсване на част от метафазите със загуба на хромозоми, отчетените клетки следва да съдържат известен брой центромери, равни на броя $2n \pm 2$.

2. ДАННИ**2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Индивидуалните данни за животните следва да се представят в таблица. Експерименталната единица е животното. За всяко изследвано животно отделно се оценява броят клетки със структурни хромозомни аберации и хромозомни аберации на клетка. Следва да се попоказват различните типове структурни хромозомни аберации с броя и честотата им за опитните и контролните групи. Празнините се записват отделно и докладват, но принципно не се включват в общата честота на аберациите.

▼B

Ако се наблюдава митоза, както и мейоза, следва да се определи съотношението на сперматогониалните митози спрямо първата и втора мейотични метафази като мярка за цитотоксичността за всички опитни животни и тези от отрицателните контроли в обща проба от 100 дялящи клетки на животното, за да се установи евентуален цитотоксичен ефект. Ако се наблюдава само митоза, митозният индекс следва да се определи в минимум 1 000 клетки за всяко животното.

2.2. ОЦЕНКА И ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Има няколко критерия за определяне на положителен резултат, като свързано с дозата увеличение в броя клетки хромозомни аберации или явно увеличение в броя на клетки с аберации при еднократна доза и еднократно вземане на проба. Първо следва да се вземе предвид биологичната значимост на резултатите. При оценката на резултатите от теста като помощно средство е възможно използването на статистически методи (8). Статистическата значимост не следва да е единственият решаващ фактор за положителна реакция. Двухазните резултати следва да се изяснят чрез допълнителни тестове, като за предпочитане е да се изменят условията на експеримента.

Тествано вещество, за което резултатите не удовлетворяват горните критерии, се счита немутагенно в настоящия тест.

Въпреки че повечето експерименти дават ясно положителни или отрицателни резултати, в редки случаи наборът данни изключва възможността да се направи категорична преценка за активността на тестваното вещество. Резултатите могат да останат двузначни или под въпрос, независимо от това колко пъти е повторен опитът.

Положителните резултати от теста *in vivo* за сперматогониални хромозомни аберации показват, че тестваното вещество индуцира структурни хромозомни аберации в зародишните клетки на тествания вид. Отрицателните резултати показват, при условията за провеждане на теста, че тестваното вещество не индуцира хромозомни аберации в зародишните клетки на тествания вид.

Следва да се обсъди вероятността тестваното вещество или метаболитите му да достигнат тъканта, която е обект на изследването.

3. ДОКЛАДВАНЕ

ДОКЛАД ЗА ТЕСТА

Докладът за теста трябва да включва следната информация:

Разтворител/носител:

- обосновка за избора на носител,
- разтворимост и стабилност на тестваното вещество в разтворител/носител, ако са известни.

Опитни животни:

- вид/щам,
- брой и възраст на животните,
- източник, условия на отглеждане, начин на хранене и др.
- индивидуално тегло на животните в началото на теста, в т.ч. обхват на телесното тегло, средни стойности и стандартно отклонение за всяка група.

▼B

Условия за провеждане на теста:

- основна причина за определяне времето на убиване на животните,
- данни от изследването за установяване на обхват, ако е проведено,
- основна причина за избора на нивото на дозата,
- подробности за приготвянето на тестваното вещество,
- подробности за администрирането на тестваното вещество,
- основна причина за определяне на момента на убиване на животните
- преминаване от концентрация (ppm) на тестваното вещество в храната/питейната вода към действителната доза (mg/kg телесно тегло), ако е приложимо,
- подробности за качеството на храната и водата,
- подробно описание на графициите на третиране и вземане на проби,
- методи на измерване на токсичността,
- идентичност на блокиращото метафазата вещество, концентрация и времетраене на третирането,
- методи на приготвяне на предметно стъкло,
- критерии за отчитане на аберации,
- брой анализирани клетки/животно,
- критерии за считане на изследванията положителни, отрицателни или двусмислени.

Резултати:

- признаци на токсичност,
- митотичен индекс,
- съотношение на сперматогониалните митозни клетки към първата и втора мейотична метафаза,
- тип и брой на аберациите, дадени отделно за всяко животно,
- общ брой аберации на група,
- брой на клетки с аберации на група,
- взаимоотношение доза—реакция, където е възможно,
- статистически анализи, ако има такива,
- паралелни отрицателни контролни данни,
- отрицателни контролни данни от предишни изследвания с обхвати, средни стойности и стандартни отклонения,
- паралелни положителни контролни данни,
- промени в плоидията, ако се забелязват.

Обсъждане на резултатите.

Заклучения.

▼B

4.

ПРЕПАТКИ

- (1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C, Lambert B., and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York, pp. 477—484.
- (2) Adler, I. D. (1984), Cytogenic tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275—306.
- (3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, Cytogenetics and Cell Genetics, 3, pp. 289—294.
- (4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson L. (1990), In Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115—141.
- (5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, Mutation Res., 52, pp. 207—209.
- (6) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, Mutation Res., 312, pp. 313—318.
- (7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 313—319.
- (8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184—232.

▼M7

▼B**Б.25. НАСЛЕДСТВЕНИ ТРАНСЛОКАЦИИ ПРИ МИШКИ****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Вижте Общо въведение част Б.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Вижте Общо въведение част Б.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Изпитването за наследствени транслокации при мишки открива структурните и бройните изменения в хромозомите в зародишни клетки от бозайници, както се проявяват при потомството от първо поколение. Откриваните хромозомни изменения са от типа на реципрочните транслокации и, ако се включи женското потомство, загуба на X-хромозоми. Носителите на транслокации и женските индивиди с XO-генотип демонстрират намалена плодовитост, която се използва за селекция на потомство от поколение F₁ за цитогенетичен анализ. Пълно безплодие се причинява от определени типове транслокации (X-автосомни и с-t-тип). Транслокациите се наблюдават цитогенетично в мейотичните клетки в метафаза I на диакинезата при мъжките индивиди от поколение F₁, или мъжкото потомство на женските от поколение F₁. Женските с XO-генотип се идентифицират генетично по наличието само на 39 хромозоми при митозите в костния мозък.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ*Подготовка*

Изпитваните химически вещества се разтварят в изотоничен физиологичен разтвор. Ако са неразтворими, те се разтварят или суспендират в подходящи носители. Използват се пряко приготвени разтвори на изпитваното съединение. Ако за улесняване на дозирането се използва носител, той не трябва да влияе на изпитваното съединение, нито да предизвиква токсични ефекти.

Начин на прилагане

Обикновено начините на прилагане са орална интубация или интраперитонеално инжектиране. Може да са целесъобразни други начини на прилагане.

Експериментални животни

За улесняване на отглеждането и цитологичното потвърждаване тези експерименти се правят с мишки. Не е необходима конкретна порода мишки. Средната големина на котилото на породата, обаче, трябва да е по-голяма от осем и да бъде относително постоянна.

Използват се здрави полово зрели животни.

▼B

Брой на животните

Броят на необходимите животни зависи от честотата на спонтанните транслокации и от минималната честота на предизвикването, необходима за положителен резултат.

Изпитването обикновено се провежда посредством анализиране на мъжкото потомство F_1 . Трябва да се изследват най-малко по 500 мъжки индивида от поколението F_1 за дозирана група. Ако се включват женските животни от поколение F_1 , необходими са 300 мъжки и 300 женски индивида.

Използване на отрицателни и положителни контроли

Трябва да съществуват адекватни данни, получени от паралелни и исторически контроли. Когато съществуват приемливи положителни контролни резултати от наскоро проведени в същата лаборатория експерименти, тези резултати могат да бъдат използвани вместо паралелна положителна контрола.

Нива на дозиране

Изпитва се едно ниво на дозиране, обикновено най-високата доза, свързана с предизвикване на минимални токсични ефекти, но без засягане на размножителното поведение или преживяването. За да се установи връзката доза/отговор, са необходими две допълнителни по-ниски дози. За нетоксичните вещества трябва да се използва експозиция на максималната възможна доза.

*Процедура***Третиране и чифтосване**

Съществуват две схеми за третиране. Най-широко се използва еднократното прилагане на изпитваното вещество. Може да се използва и прилагане на изпитваното вещество седем дни в седмицата в продължение на 35 дни. Броят на чифтосванията след третирането зависи от схемата на третиране и трябва да осигури вземане на проби от всички третирани стадии на развитие на зародишните клетки. В края на чифтосването женските животни се настаняват в индивидуални клетки. Когато женските родят, регистрират се датата, големината на котилото и полът на потомството. Цялото мъжко потомство се отбива и цялото женско потомство се изхвърля, освен ако не е включено в експеримента.

Изпитване за хетерозиготност на транслокациите

Използва се единият от два възможни метода:

— изпитване за плодовитост на потомството F_1 и последващо потвърждаване на възможните носители на транслокация чрез цитогенетичен анализ,

— цитогенетичен анализ на всички мъжки индивиди от поколението F_1 без предварителна селекция чрез изпитване за плодовитост.

a) Изпитване за плодовитост

Намалената плодовитост на даден индивид от поколение F_1 може да се установи чрез наблюдение на големината на котилото и/или анализ на съдържанието на матката при женските индивиди.

За използваната порода мишки трябва да бъдат установени критериите за определяне на нормална и намалена плодовитост.

▼B

Наблюдение на големината на котилото: Експерименталните мъжките индивиди от поколение F_1 трябва да се настанят в индивидуални клетки с женски от същия експеримент или от колонията. Клетките се проверяват ежедневно от 18-ия ден след чифтосването. Големината на котилото и полът на потомството F_2 се регистрират при раждането и след това котилата се изхвърлят. Ако се изследва женското потомство от поколение F_1 , потомството от поколение F_2 от малките котила се запазва за допълнително изпитване. Женските носители на транслокации се потвърждават посредством цитогенетичен анализ на транслокациите в пялото им мъжко потомство. Женските животни с ХО-генотип се разпознават по измененото съотношение между половете в тяхното потомство от 1:1 на 1:2 мъжки към женски индивиди. При следваща процедура нормалните животни от поколение F_1 се елиминират от допълнителното изпитване, ако първото котило от поколение F_2 достигне или превиши предварително определена нормална големина. В противен случай се наблюдават второ или трето котило от поколение F_2 .

Животните от поколение F_1 , които не могат да бъдат класифицирани като нормални след наблюдение на до три котила от поколение F_2 , се изследват допълнително чрез анализ на съдържанието на матката на женските партньори или направо се подлагат на цитогенетичен анализ.

Анализ на съдържанието на матката: Намаляването на големината на котилото при носителите на транслокация се дължи на смърт на зародиши, така че големият брой мъртви имплантирани зародиши е показателен за наличието на транслокация при експерименталното животно. Всеки от експерименталните мъжки индивиди от поколение F_1 се чифтосва с по две до три женски животни. Зачеването се установява чрез ежедневна сутрешна проверка за вагинални запушалки. Женските се пожертват 14 до 16 дни по-късно и се регистрират живите и мъртвите имплантирани зародиши в матките им.

б) Цитогенетичен анализ

Препарати от тестиси се приготвят по техниката за изсушаване с въздух. Носителите на транслокации се идентифицират по наличието на мултивалентни конфигурации в метафаза I на диакинезата на първичните сперматоцити. За да се докаже, че едно животно е носител на транслокация, трябва да се наблюдават поне две клетки с мултивалентно асоцииране.

Ако не е извършвана селекция чрез кръстосване, всички мъжки индивиди от поколение F_1 се анализират цитогенетично. Трябва да се направи микроскопски анализ на най-малко 25 клетки в метафаза I на диакинезата за мъжки индивид. При мъжките индивиди от поколение F_1 , които имат малки тестиси и мейотично разкъсване преди диакинезата, или при женски индивиди от поколение F_1 , за които се подозира, че имат ХО-генотип, трябва да се изследват митотичните метафази в сперматогонии или костен мозък. Наличието на необичайно дълга и/или къса хромозома във всяка една от 10 клетки свидетелства за особена транслокация, причиняваща безплодие при мъжките индивиди (с-t-тип). Някои Х-автосомни транслокации, които причиняват безплодие при мъжките индивиди, могат да бъдат идентифицирани само посредством анализ на ивиците на митотичните хромозоми. Наличието на 39 хромозоми при всички 10 митози свидетелства за наличие на ХО-генотип в женски индивид.

2.

ДАННИ

Данните се представят в табличен вид.

За всяко чифтосване се съобщават средната големина на котилото и съотношението между половете от чифтосванията на родителите при раждането и при отбиването.

▼B

За оценка на плодовитостта на животните от поколение F_1 се представят средната големина на котилото от всички нормални чифтосвания и големината на отделните котила на носителите на транслокации от поколение F_1 . За анализиране на съдържанието на матката се отчитат средният брой на живите и мъртвите имплантирани зародиши от нормалните чифтосвания и броят на живите и мъртвите имплантирани зародиши за всяко чифтосване поотделно за носителите на транслокации от поколение F_1 .

За цитогенетичен анализ на метафаза I на диакинезата се изброяват броят на типовете мултивалентни конфигурации и общият брой на клетките за всеки носител на транслокация.

За стерилните индивиди от поколение F_1 се съобщават общият брой чифтосвания и продължителността на чифтосването. Дават се теглата на тестисите и подробности от цитогенетичния анализ.

За женските с XO-генотип се съобщават средната големина на котилото, съотношението между половете в потомството F_1 и резултатите от цитогенетичния анализ.

Когато евентуалните носители на транслокации от поколението F_1 се селектират предварително с помощта на изпитвания за плодовитост, таблиците трябва да включват информация за това колко от индивидите са потвърдени хетерозиготи по отношение на транслокацията.

Съобщават се данните от отрицателните контроли и положителните контролни експерименти.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

3.1. **ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Ако е възможно, протоколът от изпитването съдържа следната информация:

- порода мишки, възраст на животните, тегло на третираните животни,
- брой на животните от родителското поколение от всеки пол в експерименталните и контролните групи,
- условия на изпитването, подробно описание на третирането, нива на дозиране, разтворители, схема на чифтосването,
- брой и пол на потомството за един женски индивид, брой и пол на потомството, отгледано за анализ на транслокациите,
- време и критерии за анализ на транслокациите,
- брой и подробно описание на носителите на транслокации, включително данни за кръстосването и данни за съдържанието на матката, ако е необходимо,
- цитогенетични процедури и подробности за микроскопския анализ, за предпочитане със снимки,
- статистическа оценка,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретиране на резултатите.

▼B

- 3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ
Вижте Общо въведение част Б.
- 4. **ПРЕПРАТКИ**
Вижте Общо въведение част Б.

▼B**Б.26. ТЕСТВАНЕ НА СУБХРОНИЧНА ОРАЛНА ТОКСИЧНОСТ
— 90-ДНЕВНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ТОКСИЧНОСТТА ПРИ
ГРИЗАЧИТЕ С ПОВТАРЯЩА СЕ ДОЗА****1. МЕТОД**

Този метод за изследване на субхроничната орална токсичност е точно копие на ОИСП TG 408 (1998).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Когато се извършва оценка и изчисление на токсичните характеристики на химикала, субхроничната токсичност, използваща повторни дози може да се определи, след като е била получена предварителна информация от токсичността от 28-дневни тестове на токсичността с акутна и повторена доза. 90-дневното изследване предоставя информация за възможните рискове за здравето, произтичащи по всяка вероятност от повтарящото се излагане за продължителен период от време, покриващ времето на узряване след отбиване от кърмене и развитието до пълнолетие. Това изследване предоставя информация за основните ефекти от токсичността, посочва засегнатия орган и възможността за акумулиране, както и може да предостави оценка за нивото на ненаблюдавано вредно въздействие при излагане, която може да се използва при определена доза за хронично изследване и за създаване на критерии за защита при излагане на хората.

Този метод допълнително набляга на неврологичните окончания и отбелязва въздействията върху имунната и репродуктивната системи. Набляга се и върху нуждата от обстойни клинични наблюдения, правени над животни с цел да се получи колкото е възможно повече информация. Такова изследване позволява идентификация на химикалите, които може да въздействат върху невротоксични, имунни и репродуктивни органи и което може да даде основание за по-нататъшни и по-дълбоки изследвания.

Вижте Общо въведение част Б.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Доза: е определено количество извлечено вещество, дадено за тестване. Дозата се изразява като тегло (g, mg) или като тегло на тестваното вещество върху определена единица тегло от тестваното животно (т.е. mg/kg), или като постоянни диетични концентрации (ppm).

Дозировка: е обобщен термин състоящ се от отделните дози, тяхната честота и продължителност.

NOAEL: е абrevиатура за ниво на ненаблюдавано неблагоприятно въздействие и е най-високото ниво на дозиране, където не се наблюдават неблагоприятни открития, свързани с третирането.

1.3. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА ЗА ТЕСТВАНЕ

Веществото, което се тества, се приема всекидневно през устата в последователни дози от няколко групи от експериментални животни, посредством едно ниво на дозиране за една група за период от 90 дни. По време на периода на приемането животните се наблюдават отблизо за появяване на признаци на токсичност. В края на изследването се прави аутопсия на животните, които са умрели или са убити по време на извършването на опитите, а при завършването на изследването, оцелелите животни също се убиват и се извършва аутопсия.

▼B**1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ТЕСТВАНЕ****1.4.1. Подготовка на животните**

Използват се здравите животни, които са приспособени към лабораторните условия за период от поне пет дена и които не са били обект на предишно експериментални процедури. Животните, които се използват при извършване на изследването, се характеризират според вида, рода, източника, пола, теглото и/или годините. Животните се разпределят случайно на контролни групи и групи за обработване. Клетките се подреждат така, че да се сведат до минимум възможните влияния, получени в резултата от разположението на клетките. За всяко животно се определя уникален идентификационен номер.

1.4.2. Подготовка на дозите

Веществото, което се изследва, се приема през тръбичка или при хранителен режим или чрез питейната вода. Методът на приемане на веществото през устата се определя в зависимост от целите на изследването и физичните/химични свойства на тествания материал.

При необходимост веществото, което се изследва, се разтваря или суспендира в подходящ разтворител. Където е възможно се препоръчва първо употребата на воден разтвор/суспензия, последвана от петролен разтвор/емулсия, след което е възможен разтвор с други разтворители. Трябва да се познати токсичните характеристики на разтворителите, различни от вода. По време на процеса на приемане се определя и устойчивостта на веществото, което се изследва.

1.4.3. Условия, при които се извършва теста**1.4.3.1. *Опитни животни***

Предпочитаните видове са плъхове, въпреки че могат да се използват и други видове от гризачи, например мишки. Употребяват се родовете от млади, здрави, възрастни животни, които обичайно се използват в лабораториите. Женските индивиди трябва да не са раждали и да не са бременни. Дозирането 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 измененията в теглото на използваните животни следва да бъде минимално и да не надвишава 20 % от средното за всеки пол тегло. Когато изследването се провежда като предварително по отношение на следващо дългосрочно изследване на хроничната токсичност, и за двете изследвания следва да се използват животни от същия род и източник.

1.4.3.2. *Брой и пол*

Поне 20 животни (10 женски и 10 мъжки) следва да се използват при всяко ниво на дозиране. Ако се планира умъртвяване на животни, преди завършването на изследването, броят им се увеличава в зависимост от броя на животните, които са планирани да бъдат умъртвени. Въз основа на предишни познания върху химикала или върху близък до него аналог се разглежда въпроса относно включването на допълнителна придружаваща група от 10 животни (по пет за всеки пол), поставени в контролната група и в групата с най-висока доза за наблюдаване, след периода на третиране, на способността за реверсиране и устойчивостта на всякакви токсични въздействия. Продължителността на периода след обработката се определя по подходящ начин с оглед наблюдаваните въздействия.

▼B1.4.3.3. *Нива на дозите*

Използват се поне три нива дози и една за едновременен контрол, с изключение на случаите, когато се извършват ограничени тестове (виж 1.4.3.4). Нивата на дозите може да са основани на резултатите от повтаряната доза или на обем от сведения, получени от проучвания и се вземат предвид всички съществуващи токсикологични и токсико-кинетични данни за тестваното вещество или съответните материали, които са на разположение. Освен ограничена от физико-химичната природа или биологичните въздействия на тестваното вещество, най-високото ниво на дозата се избира с цел да се намали токсичността, но не и смъртта или ужасното страдание. Избира се намаляваща последователност на нивата на дозата с оглед да се покажат всички ответни реакции и ненаблюдаваното неблагоприятно въздействие (NOAEL) на най-ниското ниво на дозата. Два от четирите затворени интервала са често оптимални за поставяне на намаляващите нива на дозата и допълнението от четвърта група за тестване често се предпочита, за да се използват големи интервали (например повече от един фактор от около 6—10) между дозирането.

Контролната група е група, която не е третирана или групата за контрол на разтворителя, при условие че разтворителят се използва при приемане на веществото, което се изследва. С изключение на самата обработка с веществото, което се изследва, животните в контролната група се третират по същия начин като тези от групите за тестване. Ако се използва разтворител, контролната група получава най-високото използвано количество от разтвора. Ако тестваното вещество се приема чрез хранителен режим и причини намалено приемане на храна, тогава една контролна група за сверяване може да бъде полезна при правенето на разлика между намаляването в резултат на липсата на вкус или токсикологични изменения при модела за изследване.

Когато е целесъобразно, се разглеждат следните характеристики на разтвора или други адитивни свойства: въздействия върху абсорбцията, разпределението, метаболизма или задържане на веществото, което се изследва; въздействия върху химичните свойства на веществото, което се изследва, което може да измени неговите токсикологични характеристики; и въздействия върху консумацията на храна и вода или хранителния статус на животните.

1.4.3.4. *Ограничен тест*

Ако тест, при ниво на дозата, равна на поне 1 000 mg/kg телесно тегло на ден, който използва процедурите, описани за това изследване, причинява ненаблюдавани неблагоприятни въздействия и ако въз основа на данни от вещества, отнасящи се до структурата, не се очаква токсичност, то пълното проучване с използване на трите нива дози не може да се счита за необходимо. Ограниченият тест се прилага, с изключение когато излагането на човека подсказва нуждата от използване на по-високо ниво доза.

1.5. ПРОЦЕДУРА

1.5.1. **Приемане на дозите**

Животните приемат дозата от тестваното вещество всеки ден в продължение на седем дни, всяка седмица за периода от 90 дни. Посочват се причините за използването на всеки друг режим на приемане на дозата, например от 5 дни. Когато вещество се приема при хранене с тръбичка, това става като една доза се дава на животното чрез стомашна тръба или подходяща интубационна канула. Максималното количество течност, което може да бъде прието наведнъж, зависи от размера на тестваното животно. Количеството не може да превишава 1 ml/100 g телесно тегло, освен в случаите на воден разтвор, когато могат да се използват 2 ml/100g телесно тегло. Освен в случаите на дразнещи и корозивни вещества, които нормално ще показват засилени въздействия с висока концентрация, променливостта в количеството се намалява до минимум чрез регулиране на концентрацията за да се осигури постоянно количество при всички нива на дозиране.



За вещества, които се приемат чрез хранителен режим или вода за пиене, е важно да се гарантира, че количеството използвано вещество за изследване не въздейства върху нормалното хранене и водния баланс. Когато веществото, което се изследва се приема чрез хранителен режим, може да се използват или постоянна хранителна концентрация (ppm) или постоянно ниво на доза от гледна точка на телесното тегло на животното; трябва да се определи използваният алтернативен вариант. За вещество, което се приема при хранене с тръбичка, дозата се дава по едно и също време всеки ден и е пригодена, в случаи на необходимост, да поддържа постоянно ниво на дозата с оглед телесното тегло на животното. Когато 90-дневното изследване се използва като предварително по отношение на дългосрочно изследване на хроничната токсичност, и при двете изследвания следва да се използва един и същ хранителен режим.

1.5.2. **Наблюдения**

Периодът на наблюдение е най-малко 90 дни. Животните от придружаващата група, които са разпределени за следващи наблюдения, се запазват за подходящ период без да бъдат третираны с цел да се уточни устойчивостта им или възстановяването от токсичните въздействия.

Поне един път на ден следва да се правят основни клинични наблюдения, за предпочитане по едно и също време, като се разглежда максималния период на предвидените въздействия след получаване на дозата. Клиничните условия, при които живеят животните, следва да се описват. Поне два пъти на ден, обикновено в началото и в края на деня, всички животни се оглеждат за проявени признаци на заболяемост или смъртност.

Поне един път преди първото излагане (с цел да е възможно сравнение в рамките на обекта) и след това поне веднъж в седмицата на всички животни следва да се правят подробни клинични изследвания. Тези изследвания се правят извън клетката, която обитава животното, за предпочитане в стандартна обстановка и във всички случаи по едно и също време. Тези изследвания се описват внимателно, за предпочитане се използват изчислителни системи, изрично определени от лабораторията, която извършва теста. Полагат се необходимите усилия, за да се гарантира, че променливостта в условията за наблюдаване е минимална. Забелязаните признаци следва да включват, но не и да се ограничават само с: изменения в кожата, козината, очите, лигавиците, появяване на секрети и екскреция и органична независима активност (например лакримация, пило-ерекция, размер на зеницата, необикновена респираторна схема). Записват се също и изменения в походката, стойката и чувствителност при маневриране, както и наличието на спазми или свивания на мускулите, стереотипа (например остатъчно дращене, повтарящо се обикаляне в кръг) или странно държание (например самоосакатяване, вървене назад) (1).

Преди приемането на веществото, което се изследва и при приключването на изследването, се прави офталмологичен преглед чрез използване на офталмоскоп или равнозначно подходящо оборудване, за предпочитане на всички животни, но поне при групата с най-високо ниво доза и контролната група. Ако се открият изменения при очите, всички животни се подлагат на преглед.

Към края на изследването и във всички случаи не по-рано от единадесетата седмица, се проверява чувствителната реактивност по отношение на различни видове стимуланти (1) (например слухови, визуални и проприосептични стимуланти) (2), (3), (4), оценка на силата при хващане (5) и оценка на двигателната активност (6). Допълнителни уточнения по процедурите, които могат да се следват, са дадени в съответните препратки. Въпреки всичко могат да се използват и алтернативни процедури, различни от тези, към които се препраща.

Проведените в края на изследването функционални наблюдения могат се пропуснат, когато са на разположение данните от функционалните наблюдения от други изследвания и когато всекидневните клинични наблюдения не показват никакви функционални недостатъци.

▼B

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 функционалния тест.

1.5.2.1. *Телесно тегло и консумация на храна/вода*

Теглото на всички животни следва да се измерва поне един път в седмицата. Консумацията на храна също се измерва един път седмично. Ако веществото, което се изследва, се приема чрез водата за пиене, един път в седмицата се измерва и консумацията на вода. Консумацията на вода може също да се вземе предвид при проучвания на хранителния режим или при хранене с тръбичка, когато питейната активност може да се измени.

1.5.2.2. *Хематология и клинична биохимия*

Ако е приложимо, при определени условия се вземат и се запазват кръвните проби от избран обект. В края на изследването пробите се събират точно преди или като част от процедурата по умъртвяването на животните.

В края на изследването и когато могат да се съберат някои промеждутъчни кръвни проби, се правят и следните хематологични изследвания: хематокрит, концентрация на хемоглобин, брой на еритроцитите, общ и отделен брой на левкоцитите, брой на тромбоцитите и измерване на времето на съсирване/възможно.

За да се изследват основните токсични въздействия върху тъканите, и по-специално въздействията върху бъбреците и черния дроб, върху кръвните проби, взети от всяко животно точно преди или като част от процедурата по умъртвяване на животните (като част от тези, които са намерени умиращи и/или междуременно умъртвени), се извършват клинични биохимични изследвания. По подобен на хематологичните изследвания начин, може между другото да се вземат проби и за клиничен биохимичен тест. Препоръчва се в нощта преди вземането на кръвните проби да не се дава на животните месо за консумиране⁽¹⁾. Изследванията на плазма и серум следва да включват натрий, калий, глюкоза, холестероли, карбамид, хелио-азотен карбамид, креатинин, протеини и албумини и повече от два ензими, показващи чернодробно-клетъчно въздействие (като аланин аминотрансфераза, аспарат аминотрансфераза, алкална фосфатаза, гама глутамил траспепидаза, сорбитолна дехидрогеназа). Може да се включат и изследвания на с допълнителни ензими (на хепатит или с друг произход) и жлъчни киселини, които могат да дадат полезна информация при определени обстоятелства.

По избор през последната седмица от изследването може да се направят изследвания на урината, като се използва синхронно събраното количество урина: външен вид, количество, осмоза и относително тегло, рН, протеини, глюкоза и кръв/кръвни клетки.

Като допълнение следва да се предвидят проучвания на маркерите за серума на основните увреждания на тъканите. Други изчисления се извършват, ако познатите свойства на тестваното вещество могат или се подозира, че могат да въздействат върху съответните метаболитни профили включително калций, фосфор, постни триглицериди, специфични хормони, метамоглобин и холистераза. Тези изчисления е нужно да се определят за химикалите от определени класове или въз основа на всеки отделен случай.

⁽¹⁾ За измерванията на серума и плазмата, и най-вече за глюкозата, се препоръчва през нощта да не се консумира месо. Основната причина за това е нарасналата променливост, която в резултат от храненето с месо би могла непредвидимо да доведе до лъжливи ефекти и до проблеми при тълкуването. От друга страна обаче, липсата на месо през нощта въздейства върху метаболизма на животните, и по-специално при изследване на храненето може да наруши дневното излагане на веществото, което се изследва. Ако се възприеме животното да не се храни с месо през нощта преди изследването, то клиничните биохимични изследвания се извършват след провеждането на функционалните наблюдения по изследването

▼B

Накрая има нужда от гъвкав подход, в зависимост от видовете и от наблюдаваното и/или очаквано въздействие от всяко дадено вещество.

Ако основните сведения са недостатъчни, следва да се вземе предвид дали е необходимо хематологичната или клиничната биохимична променливост да се определят преди започване на приемането на дозите; по принцип не се препоръчва тези данни да се генерират преди третирането (7).

1.5.2.3. *Обща аутопсия*

Всички животни, подложени на експеримент, са обект на пълна, подробна аутопсия, която включва внимателен преглед на външната повърхност на тялото, всички отвори и мозъчната, гръдната и коремната кухини и тяхното съдържание. Черният дроб, бъбреците, надбъбречните жлези, тестисите, епидимидите, матката, яйчниците, тимуса, далака, мозъка и сърцето на всички животни (без тези, които са намерени заболели и/или са междувременно умъртвени) се почистват от полепналите по тях тъкани, когато е целесъобразно, и след дисекцията колкото е възможно по-скоро се измерва тяхното мокро тегло за да се избегне изсушаването.

Следните тъкани се запазват при най-подходящата консервираща среда за вида тъкан и за очакваните последващи хистопатологични изследвания: общи наранявания, мозък (представени области включващи главен, малък и костен мозък, гръбначен мозък (на три нива: шиен, среден и лумбален), хипофизна жлеза, щитовидна жлеза, паратиroid, тимус, хранопровод, слюнчени лимфни жлези, стомах, дебели и тънки черва (включително Пайеровите плочки), черен дроб, панкреас, бъбреци, надбъбречните жлези, далака, сърцето, трахеята и белия дроб (запазени чрез надуване с фиксатор и след това потапяне в течност), аорта, гонадите, матката, вторични полови органи, женски млечни жлези, простата, пикочен мехур, жлъчен мехур (мишка), лимфни възли (за предпочитане един лимфен възел, по пътя на приемането и друг по-далече от него, за да се покрият и систематичните въздействия), периферни нерви (седалище и пищял) за предпочитане близо до мускул, разрез на кост с костен мозък (и/или кост с изваден костен мозък), кожата и очите (ако са наблюдавани изменения по време на офталмологичните изследвания). Клиничните и другите сведения могат да посочат необходимостта от допълнителни изследвания на тъканите. Всички други органи, които на основата на познатите свойства на тестваното вещество, се считат за вероятни обекти, също се запазват.

1.5.2.4. *Хистопатология*

Пълна хистопатология се извършва на запазените органи и тъкани на всички животни от контролните групи и групите с висока доза. Тези прегледи следва да се приложат и за животните от всички други групи, получили дозата, ако се наблюдават изменения в резултат от третирането на групата с най-висока доза.

Преглеждат се всички общи наранявания.

Когато се използва придружаваща група, хистопатология се извършва на тъканите и органите с показано въздействие в третираните групи.

▼B**2. ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ****2.1. ДАННИ**

Предоставят се индивидуални данни. Допълнително се синтезират данни в таблична форма, показваща за всяка тествана група броя на животните при започване на теста, броя на животните, които са открити мъртви по време на изследването или са били умъртвени и времето на смъртта или умъртвяването, броя на проявените признаци на токсичност, описание на признаците на наблюдаваната токсичност, включително времето на започването, продължителността и остротата на всички токсични въздействия, броя на животните с наранявания, вида на нараняванията и процента на животните за всеки отделен вид нараняване.

Когато е необходимо, се оценяват числовите резултати чрез използване на подходящ и основно приемлив статистически начин. Статистическите методи и данни, които трябва да се анализират, следва да се избират по време на планирането на изследването.

2.2. ОТЧИТАНЕ

Докладът от проведеното изследване трябва да включва следната информация:

2.2.1. Веществото, което се изследва:

- физична същност, чистота и физико-химични свойства,
- идентификационни данни,
- разтвор (ако е приложимо): посочване на причините за избор на разтвор, различен от водата.

2.2.2. Видове животни, които се тестват:

- използвани видове и родове животни,
- брой, възраст и пол на животните,
- произход, условия на обитаване, хранителен режим и т.н.,
- индивидуално тегло на животните при започването на изследването.

2.2.3. Условията, при които се извършва изследването:

- рационален избор на нивото доза,
- подробности за образуването/подготовката на хранителния режим, постигнатата концентрация, стабилност и хомогенност на разтвора,
- подробности за приемането на тестваното вещество,
- действителната доза (mg/kg дневно телесно тегло) и фактора на конверсия от концентрация на тестваното вещество в хранителния режим/питейната вода (ppm) към действителната доза, ако е приложимо,
- подробности за качеството на храната и водата.

2.2.4. Резултати:

- телесно тегло и промените в него,
- консумацията на храна и вода, ако е приложимо,
- съответните данни за токсичността според пола и нивото доза, включително проявените признаци на токсичност,

▼B

- същност, острота и продължителност на клиничните наблюдения (обратими или не),
- резултатите от офтолмологичните наблюдения,
- оценка на сетивната активност, силата при хващане и двигателната активност (когато са налични),
- хематологични тестове със съответните основни стойности,
- клинични биохимични тестове със съответните основни стойности,
- телесно тегло при завършване на експеримента, тегло на органите и съотношението между телесното тегло и теглото на органите,
- данни от аутопсията,
- подробно описание на всички хистопатологични сведения,
- данни от абсорбцията, ако са на разположение,
- статистически обработените резултати, където е приложимо.

Обсъждане на резултатите

Заключения

3.

ПРЕПРАТКИ

- (1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.
- (2) Tupper, D. E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, pp. 999—1003.
- (3) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, pp. 691—704.
- (4) Moser, V. C, Mc Daniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, pp. 267—283.
- (5) Meyer O. A., Tilson H. A., Byrd W. C, Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxivol.*, 1, pp. 233—236.
- (6) Crofton K. M., Howard J. L., Moser V. C, Gill M. W., Reiter L. W., Tilson H. A., MacPhail R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, pp. 599—609.
- (7) Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996). „Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies“, *Fundam. & Appl. Toxicol.*, 29, pp. 198—201.

▼B

Б.27. ИЗСЛЕДВАНЕ НА СУБХРОНИЧНА ОРАЛНА ТОКСИЧНОСТ — 90-ДНЕВНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ТОКСИЧНОСТТА ПРИ НЕ-ГРИЗАЧИ С ПОВТАРЯЩА СЕ ДОЗА

1. МЕТОД

Този метод за изследване на субхроничната орална токсичност е точно копие на OECD TG 409 (1998).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

След получаване на предварителна информация върху токсичността при извършване на 28-дневни тестове за акутна и повторна доза, при извършването на оценка и изчисляване на токсичните характеристики на химикала може да се определи субхроничната токсичност, използваща повторна дози. 90-дневното изследване предоставя информация за възможните рискове за здравето, произтичащи по всяка вероятност от повтарящото се излагане за периода на бързо порастване и от младост към зрелост. Това изследване предоставя информация за основните токсични въздействия, посочва засегнатия орган и възможността за акумулиране, като може да предостави и оценка на нивото на ненаблюдаваните неблагоприятни въздействия при излагане, която може да се използва при определена доза за хронично изследване и за създаване на критерии за защита при излагане на хората.

Този метод на тестване позволява идентификация на вредните въздействия от химичното излагане върху видовете не-гризачи и следва да се използва само:

- когато наблюдаваните въздействия при други проучвания показват нуждата от изясняване/характеризиране при втори видове не-гризачи, или
- когато токсикокинетичните изследвания показват, че употребата на определени видове не-гризачи е по-подходящият избор за лабораторно животно, или
- когато други специфични причини оправдават използването на не-гризачи.

Вж. също Основно въведение, част Б.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Доза: е определено количество извлечено вещество, дадено за тестване. Дозата се изразява като тегло (g, mg) или като тегло на тестваното вещество върху определена единица тегло от тестваното животно (т.е. mg/kg), или като постоянни диетични концентрации (ppm).

Дозировка: е обобщен термин, който включва отделните дози, тяхната честота и продължителност.

NOAEL: е абривиатура за ниво на ненаблюдавано вредно въздействие и е най-дозираното ниво, където не се наблюдават вредни резултати от съответната обработка.

1.3. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА ЗА ТЕСТВАНЕ

Веществото за тестване се приема всекидневно през устата в последователни дози за няколко групи от експериментални животни, по една доза за група за период от 90 дни. По време на периода на предписването животните се наблюдават отблизо за поява на някакви признаци на токсичност. В края на изследването се прави аутопсия на животните, които умират или са убити по време на извършването на тестването, а оцелелите животни също се умъртвяват и се извършва аутопсия.

▼B

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ТЕСТВАНЕ

1.4.1. **Избор на видове животни**

Обикновено от не-гризачите се използват кучета, които се отглеждат при определени условия; най-често се използват дребните породи. Други видове, като свине, минипрасета, също могат да се използват. Не се препоръчва използването на примати и тяхното използване следва да е обосновано. Използват се млади и здрави животни, а когато се използват кучета, дозата следва да се дава на 4—6-месечни животни и не по-късно от деветия месец на първата година. Когато изследването се провежда като предварително по отношение на следващо дългосрочно хронично изследване на токсичността, и за двете изследвания следва да се използват животни от същия вид и род.

1.4.2. **Подготовка на животните**

Използват се млади здрави животни, които са адаптирани към лабораторните условия и не са били обект на предишни експериментални процедури. Продължителността на аклиматизацията ще зависи от определените за тестване видове и техния произход. Препоръчват се поне пет дни за кучетата и специално отглежданите за целта свине от постоянна колония и поне две седмици за другите животни, ако са с друг произход. Животните, използвани за извършване на теста, се определят според вида, рода, произхода, пола, теглото и/или възрастта. Животните се разпределят на случаен принцип в контролни групи и групи за обработване. Животните се разпределят на случаен принцип в контролни групи и групи за обработване. Клетките се подреждат така, че да се сведат до минимум възможните влияния, получени в резултат от разположението на клетките. За всяко животно се определя уникален идентификационен номер.

1.4.3. **Подготовка на дозите**

Веществото за тестване се приема през тръбичка или чрез храната или питейната вода. Методът на приемане на веществото през устата се определя в зависимост от целите на изследването и физичните/химичните свойства на тествания материал.

При необходимост изследваното вещество се разтваря или суспендира в подходящ разтворител. Където е възможно, се препоръчва първо употребата на воден разтвор/суспензия, последвана от петролен разтвор/емулсия, след това е възможен разтвор с друг разтворител. За разтворители, различни от вода, следва да се познават токсичните характеристики. Определя се и устойчивостта на тестваното вещество по време на процеса на извличане.

1.5. ПРОЦЕДУРА

1.5.1. **Брой и пол на животните**

Поне 8 животни (4 женски и 4 мъжки) следва да се използват при всяко ниво на доза. Ако междувременно се планира убиване на животни преди завършването на изследването, броят се увеличава в зависимост от броя на животните, които е планирано да бъдат убити. Броят на животните при завършване на проучването следва да бъде достатъчен за даване на съдържателна оценка на токсичните въздействия. Въз основа на предишни познания върху химикала или върху близък до него аналог се разглежда въпросът относно включването на допълнителна придружаваща група от 8 животни (по четири от всеки пол), поставени в контролната група и в групата с най-висока доза за наблюдаване, след периода на третиране, на способността за реверсиране и устойчивостта на всякакви токсични въздействия. Продължителността на периода след обработката се определя с оглед наблюдаваните резултати.

▼B**1.5.2. Дозиране**

Използват се поне три нива на доза и се осъществява едновременен контрол, с изключение на случаите, когато се извършва ограничен тест (вж. 1.5.3.). Нивата на дози може да са основани на резултати от повтаряща се доза или обем от сведения, получени от проучвания, и следва да се вземат предвид всички съществуващи токсикологични и токсикокинетични данни, които са на разположение, за тестваното вещество или съответните материали. Освен ограничението от физикохимичната природа или биологичните въздействия на тестваното вещество, най-високото ниво на дозата се избира с цел да се индуцира токсичност, но не и смърт или силно страдание. Избира се намаляваща последователност на нивата на дозата с оглед да се покаже всяка ответна на дозата реакция и ненаблюдаваното неблагоприятно въздействие (NOAEL) на най-ниското ниво на дозата. Два до четири затворени интервала са най-често оптимални за поставяне на намаляващите нива на дозата и често се предпочита допълнение от четвърта група за тестване, за да се използват големи интервали (например повече от един фактор от около 6—10) между дозирането.

Контролната група е група, която не е третирана или група, която контролира разтворителя, при условие че разтворителят се използва при приемане на веществото, което се изследва. С изключение на самата обработка с веществото, което се изследва, животните в контролната група се третират по същия начин като тези от групите за тестване. Ако се използва разтворител, контролната група получава най-високото използвано количество от разтвора. Ако тестваното вещество се приема чрез хранителен режим и причини намалено приемане на храна, тогава една група, която е на същия хранителен режим, при сверяване може да бъде полезна, за да се направи разлика между намаляването, дължащо се на липсата на вкус или вследствие на токсикологични изменения при модела за изследване.

Когато е целесъобразно, се разглеждат следните характеристики на разтвора или други адитивни свойства: въздействия върху абсорбцията, разпределението, метаболизма или задържане на веществото, което се изследва; въздействия върху химичните свойства на веществото, което се изследва, което може да измени неговите токсикологични характеристики; и въздействия върху консумацията на храна и вода или хранителния статус на животните.

1.5.3. Ограничен тест

Ако тестът при едно ниво на доза, равно на поне 1 000 mg/kg телесно тегло на ден, и при използване на процедурите, описани за това изследване, води до ненаблюдавани неблагоприятни въздействия и ако въз основа на данни от вещества, отнасящи се до структурата, не се очаква токсичност, то пълното проучване с използване на трите нива дози не може да се счита за необходимо. Прилага се ограниченият тест, с изключение на случая, когато излагането на човека подсказва нуждата от използване на по-високо ниво на доза.

1.5.4. Приемане на дозите

Животните приемат дозата от тестваното вещество всеки ден в продължение на седем дни, всяка седмица за периода от 90 дни. Посочват се причините за използването на всеки друг режим на приемане на дозата, например 5 дни. Когато вещество се приема при хранене с тръбичка, това става, като една доза се дава на животното през стомашна тръба или подходяща интубационна канюла. Максималното количество течност, което може да бъде прието наведнъж, зависи от размера на тестваното животно. Обикновено количеството се задържа възможно най-ниско. С цел да се осигури постоянно количество на нивото доза, променливостта на количеството се намалява до минимум чрез регулиране на концентрацията, освен в случаите на дразнещи и корозивни вещества, които нормално ще показват засилени въздействия с висока концентрация.

▼ B

За вещества, които се приемат чрез хранителен режим или вода за пиене, е важно да се гарантира, че количеството използвано за изследване вещество не въздейства върху нормалното хранене и водния баланс. Когато тестваното вещество се приема чрез хранителен режим, може да се използва или постоянна хранителна концентрация (ppm), или постоянно ниво на доза от гледна точка на телесното тегло на животното; следва да се определи и алтернативен вариант на употреба. За вещество, което се приема при хранене с тръбичка, дозата се дава по едно и също време всеки ден и е съобразена в случаи на необходимост да се поддържа постоянно ниво доза с оглед телесното тегло на животното. Когато 90-дневното изследване се използва като предварително по отношение на дългосрочно изследване на хроничната токсичност, и при двете изследвания следва да се използва един и същ хранителен режим.

1.5.5. Наблюдения

Периодът на наблюдение е 90 дни. Животните от придружаващата група, които са разпределени за следващи наблюдения, се запазват за подходящ период, без да бъдат третирани с цел да се уточни устойчивостта има или възстановяването от токсичността.

Поне един път на ден се правят основни клинични наблюдения, за предпочитане по едно и също време, като се взема предвид максималният период на предвидените въздействия след получаване на дозата. Клиничните условия, при които живеят животните, се описват. Поне два пъти на ден, обикновено в началото и в края на деня, всички животни се оглеждат за проявени признаци на заболяемост или смъртност.

Поне един път преди първото излагане (с цел да е възможно сравнение в рамките на обекта) и след това поне веднъж в седмицата на всички животни следва да се правят подробни клинични изследвания. Тези изследвания следва да се правят извън клетката, която обитава животното, за предпочитане в стандартна обстановка и във всички случаи по едно и също време. Тези изследвания се описват внимателно, за предпочитане се използват изчислителни системи, изрично определени от лабораторията, която извършва теста. Полагат се необходимите усилия, за да се гарантира, че променливостта в условията за наблюдаване е минимална. Забелязаните признаци следва да включват, но не се ограничават само със: изменения в кожата, козината, очите, лигавиците, появяване на секреция и екскреция и органична независима активност (например лакримация, пилоерекция, размер на зеницата, необикновена респираторна схема). Записват се също и изменения в походката, стойката и чувствителността при маневриране, както и наличието на спазми или свивания на мускулите, стереотипа (например остатъчно дращене, повтарящо се обикаляне в кръг) или странно държане (например самоосакатяване, вървене назад).

Преди приемането на изследваното вещество и при приключването на изследването се прави офталмологичен преглед чрез използване на офталмоскоп или равнозначно подходящо оборудване, за предпочитане на всички животни, но поне при групата с най-високо ниво на доза и контролната група. Ако се открият изменения, очевидно свързани с третирането, всички животни се подлагат на преглед.

1.5.5.1. Телесно тегло и консумация на храна/вода

Теглото на всички животни се измерва поне един път в седмицата. Консумацията на храна също се измерва един път седмично. Ако тестваното вещество се приема чрез водата за пиене, един път в седмицата се измерва и консумацията на вода. Консумацията на вода може също да се вземе предвид за проучвания на хранителния режим или при хранене с тръбичка, когато питейната активност може да се измени.

▼B

1.5.5.2. *Хематология и клинична биохимия*

Ако е приложимо, при определени условия се вземат и се запазват кръвни проби от избран обект. В края на изследването пробите се събират точно преди или като част от процедурата по умъртвяването на животните.

В началото на изследването и след това или на интервали от един месец, или в средата на периода на извършване на теста и последно в края на този период се правят и следните хематологични изследвания: хематокрит, концентрация на хемоглобин, брой на еритроцити, общ и отделен брой на левкоцитите, брой на тромбоцитите и измерване на възможността на съсирване, като време на съсирване или протромбиново време, или тромбoplastиново време.

За да се изследват основните токсични въздействия върху тъканите, и по специално въздействията върху бъбреците и черния дроб, върху кръвните проби, взети от всяко животно в началото и след това или на интервали от един месец, или в средата на периода на извършване на теста и последно в края на този период, се извършват клинични биохимични изследвания. Зоните, които се изследват, са електролитният баланс, карбохидратният метаболизъм и функциите на черния дроб и бъбреците. Изборът на специфичните тестове ще се повлияе от вида на действие на тестваното вещество. Препоръчва се в нощта преди вземането на кръвните проби да не се дава на животните месо за консумиране. Предложените изчисления включват калций, фосфор, хлор, натрий, калий, глюкоза, аланин аминотрансфераза, аспарат аминотрансфераза, орнитин декарбоксилаза, гама глутамил трасептидаза, карбамиден азот, албумин, кръвен креатинин, общ билирубин и общи изчисления на серумен протеин.

Поне в началото на изследването и след това в средата на периода на извършване на теста и последно в края на този период време на последната седмица от изследването може да се направят изследвания на урината, като се използва синхронно събраното количество урина. Тези изследвания включват: външен вид, количество, осмотичност и относително тегло, рН, протеини, глюкоза и кръв/кръвни клетки. Когато е необходимо, с оглед разширяване на проучването върху наблюдаваните въздействия, могат да се използват и допълнителни параметри.

Като допълнение следва да се предвиди проучване на знаците за увреждане на основните тъкани. Други изследвания, които могат да са полезни за адекватна оценка на токсичността, включват анализ на липиди, хормони, киселинно-основен баланс, метаглобин и холинестеразна инхибиция. Може да се извърши допълнителна биохимия, когато е необходимо да се разширят проучванията върху наблюдаваните въздействия. Тези нужди се определят за химикалите от определени класове или въз основа на всеки отделен случай.

Накрая има нужда от гъвкав подход, в зависимост от видовете и от наблюдаваното и/или очакваното въздействие от всяко дадено вещество.

1.5.5.3. *Обща аутопсия*

Всички животни, подложени на експеримент, са обект на пълна, подробна аутопсия, която включва внимателен преглед на външната повърхност на тялото, всички отвори и мозъчната, гръдната и коремната кухина и тяхното съдържание. Черният дроб с жлъчния мехур, бъбреците, надбъбречните жлези, тестисите, епидидимидите, матката, яйчниците, щитовидната жлеза (с паратироидите), тимусът, далакът, мозъкът и сърцето на всички животни (без тези, които са намерени умиращи и/или са междувременно умъртвени) се почистват от поленалите по тях тъкани, когато е приложимо, и след дисекцията колкото е възможно по-скоро се измерва тяхното мокро тегло, за да се избегне изсушаването.

▼B

Следните тъкани следва да бъдат запазвани при най-подходящата консервираща среда за вида тъкан и за очакваните последващи хистопатологични изследвания: общи наранявания, мозък (представени области, включващи главен, малък и костен мозък, гръбначен мозък (на три нива: шиен, среден и лумбален), хипофизна жлеза, очи, щитовидна жлеза, паратироид, тимус, хранопровод, слюнчени лимфни жлези, стомах, дебели и тънки черва (включително Пайерови плочки), черен дроб, жлъчен мехур, панкреас, бъбреци, надбъбречни жлези, далак, сърце, трахея и бял дроб, аорта, полови жлези, матка, вторични полови органи, женски яйчни жлези, простата, пикочен мехур, лимфни възли (за предпочитане един лимфен възел, по пътя на приемането, и друг по-далече от него, за да се покрийт и систематичните въздействия), периферни нерви (седалище и пищял), за предпочитане близо до мускул, разрез на кост с костен мозък (и/или кост с изваден костен мозък), кожа и очи (ако са наблюдавани изменения по време на офталмологичните изследвания). Клиничните и другите сведения могат да посочат необходимостта от допълнителни изследвания на тъканите. Всички други органи, които на основата на познатите свойства на тестованото вещество се считат за вероятни обекти, също следва да бъдат запазвани.

1.5.5.4. *Хистопатология*

Пълна хистопатология следва да се извършва на запазените органи и тъкани на всички животни от контролните групи и групите с висока доза. Тези прегледи следва да се приложат и за животните от всички други групи, получили доза, ако се наблюдават изменения в резултат от третирането на групата с най-висока доза.

Изследват се всички общи наранявания.

Когато се използва придружаваща група, хистопатология се извършва на тъкани и органи с показан ефект при третираните групи.

2. **ДАНИ И ДОКЛАДВАНЕ**2.1. **ДАНИ**

Предоставят се индивидуални данни. Допълнително се синтезират данни в таблична форма, показваща за всяка тествана група броя на животните при започване на теста, броя на животните, които са открити мъртви по време на изследването или са били умъртвени, и времето на смъртта или умъртвяването, броя на проявените признаци на токсичност, описание на признаците на наблюдаваната токсичност, включително времето на започването, продължителността и остротата на всички токсични въздействия, броя на животните с наранявания, вида на нараняванията и процента на животните за всеки отделен вид нараняване.

Когато е необходимо, числовите резултати следва да се оценяват чрез използване на подходящ и общоприемлив статистически метод. Статистическите методи и данни, които следва да се анализират, се избират по време на проектирането на изследването.

2.2. **ОТЧИТАНЕ**

Докладът от проведеното изследване следва да включва следната информация:

▼B

- 2.2.1. **Вещество за тестване**
- физична същност, чистота и физикохимични свойства,
 - идентификационни данни,
 - разтвор (ако е приложимо): посочване на причините за избор на разтвор, различен от водата.
- 2.2.2. **Видове животни, с които се извършва тестването**
- използвани видове и родове животни,
 - брой, възраст и пол на животните,
 - произход, условия на обитаване, хранителен режим и т.н.,
 - индивидуално тегло на животните при започването на изследването.
- 2.2.3. **Условията, при които се извършва изследването**
- рационален избор на нивото доза,
 - подробности за образуването/подготовката на хранителния режим, постигнатата концентрация, стабилност и хомогенност на разтвора,
 - подробности за приемането на тестваното вещество,
 - действителната доза (mg/kg телесно тегло дневно) и коефициент на пропорционалност от хранителния режим/питейната вода на концентрация на тестваното вещество (ppm) към действителната доза, ако е приложимо,
 - подробности за качеството на храната и водата.
- 2.2.4. **Резултати:**
- телесно тегло и промените в него,
 - консумацията на храна и вода, ако е приложимо,
 - съответните данни за токсичността според пола и нивото доза, включително проявените признаци на токсичност,
 - същност, острота и продължителност на клиничните наблюдения (обратими или не),
 - резултатите от офталмологичните наблюдения,
 - хематологични тестове със съответните основни стойности,
 - клинични биохимични тестове със съответните основни стойности,
 - телесно тегло при завършване на експеримента, тегло на органите и съотношението между телесното тегло и теглото на органите,
 - данни от аутопсията,
 - подробно описание на всички хистопатологични сведения,
 - данни от абсорбцията, ако са на разположение,
 - статистически обработените резултати, където е приложимо.
- Обсъждане на резултатите.
- Заклучения.

▼B**Б.28. ИЗПИТВАНЕ ЗА СУБХРОНИЧНА ДЕРМАЛНА ТОКСИЧНОСТ. 90-ДНЕВНИ МНОГОКРАТНИ ДЕРМАЛНИ ДОЗИ ПРИ ГРИЗАЧИ****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Вижте Общо въведение, част Б.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Вижте Общо въведение, част Б.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Изпитваното вещество се прилага ежедневно върху кожата, в нарастващи дози, върху няколко групи експериментални животни, по една доза за група, в продължение на 90 дни. По време на прилагането животните се наблюдават ежедневно, за да се открият признаци на токсичност. Животните, които умират по време на изпитването, се подлагат на аутопсия, а преживелите животни се подлагат на аутопсия при приключване на изпитването.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ**Подготовка**

Животните се държат при експериментални условия на живот и хранене в продължение поне на пет дни преди изпитването. Преди изпитването здрави млади животни се избират по случаен признак и се разпределят в третирана и контролна група. Малко преди изпитването кожата в дорзалната област на туловището на експерименталните животни се подстригва. Може да се използва бръснене, но то следва да се извършва приблизително 24 часа преди изпитването. Повторно подстригване или бръснене е необходимо обикновено през интервали от една седмица. Когато козината се подстригва или бръсне, следва да се внимава да се избягва ожулване на кожата. Не по-малко от 10 % от повърхността на тялото следва да бъде подготвена за прилагане на изпитваното вещество. Когато се решава каква повърхност следва да бъде подготвена и какви да бъдат размерите на превръзката, следва да се вземе предвид теглото на животното. Когато се изпитват твърди вещества, които при нужда могат да бъдат стрити на прах, изпитваното вещество следва да бъде достатъчно намокрено с вода или с подходящ носител, когато е необходимо, за да се осигури добър контакт с кожата. Течните изпитвани вещества обикновено се използват неразредени. Прилагането е ежедневно, пет до седем дни седмично.

Условия на изпитване**Експериментални животни**

Могат да се използват възрастни плъхове, зайци или морски свинчета. Могат да се използват други видове, но употребата им трябва да бъде обоснована. При започване на изпитването диапазонът на колебание на теглото трябва да бъде $\pm 20\%$ от средното тегло. Когато изпитването за субхронична дермална токсичност се провежда като предварително проучване преди продължително изпитване, и при двете изпитвания трябва да се използват същият вид и порода.



Брой и пол

За всяко ниво на дозиране трябва да се използват поне 20 животни (10 женски и 10 мъжки) със здрава кожа. Женските трябва да са нераждали и да не са бременни. Ако се планират междинни жертви, броят трябва да бъде увеличен с броя животни, които са планирани за пожертване преди завършване на изпитването. Допълнително една сателитна група от 20 животни (по 10 животни от пол) може да бъде третирана при високо ниво на дозиране в продължение на 90 дни и да бъде наблюдавана в продължение на 28 дни след третирането за обратимост, запазване или забавена проява на токсични ефекти.

Нива на дозиране

Необходими са поне три нива на дозиране с контрол или контрол за носителя, ако се използва носител. Експозицията трябва да продължава поне по шест часа дневно. Прилагането на изпитваното вещество трябва да се извършва по едно и също време всеки ден и количеството на прилаганото вещество трябва да бъде коригирано през определени интервали (от една или две седмици), за да се поддържа постоянно ниво на дозиране по отношение на телесното тегло на животното. Освен третирането с изпитваното вещество, животните от контролната група трябва да бъдат третирани по идентичен начин с животните от изпитваните групи. Когато за подпомагане на дозирането се използва помощно вещество, дозирането на контролната група с носител трябва да бъде същото, както при третираните групи, и контролната група трябва да получава същото количество носител, като това, което получава групата на най-висока доза. Най-високото ниво на дозиране трябва да води до токсични ефекти, но да не предизвиква или да предизвиква малък брой фатални изходи. Най-ниското ниво на дозиране не трябва да предизвиква никакви признаци на токсичност. Когато съществува оценка на експозицията при хора, която може да се използва, най-ниското ниво на дозиране трябва да е по-високо. В идеалния случай, междинното ниво на дозиране трябва да предизвиква минимални видими токсични ефекти. Ако се използва повече от една междинна доза, нивата на дозиране трябва да бъдат разделени едно от друго, така че да се получи градиране на токсичните ефекти. При групите на ниска и междинни дози и при контролните групи, честотата на фаталните изходи трябва да бъде ниска, така че да позволи значима оценка на резултатите.

Ако прилагането на изпитваното вещество води до силно кожно дразнене, концентрациите трябва да бъдат намалени и това може да доведе до намаляване или липса на други токсични ефекти при високото ниво на дозиране. Ако кожата е силно увредена, може да се наложи прекратяване на изпитването и предприемане на ново изпитване при по-ниска концентрация.

Гранично изпитване

Може да се приеме, че допълнително изпитване не е необходимо, ако е известно, че предварително проучване при доза 1 000 мг/кг или по-висока, която е свързана с възможна експозиция при хора, не предизвиква токсични ефекти.

Период на наблюдение

Експерименталните животни трябва ежедневно да бъдат наблюдавани за признаци на токсичност. Трябва да се регистрират времето на смъртта и времето, по което се появяват и изчезват признаците на токсичност.



Процедура

Животните трябва да бъдат настанени в индивидуални клетки. В идеалния случай животните се третират с изпитваното вещество седем дни в седмицата в продължение на 90 дни.

Животните от всяка сателитна група, планирана за контролни наблюдения, трябва да бъдат гледана в продължение на допълнителни 28 дни без третиране, за да бъдат открити възстановяването от токсичните ефекти или запазването им. Експозицията трябва да продължава шест часа на ден.

Изпитваното вещество трябва да бъде прилагано по еднакъв начин върху площ, която представлява приблизително 10 % от общата площ на телесната повърхност. При силно токсични вещества покритата повърхностна площ може да бъде по-малка, но колкото е възможно по-голяма площ трябва да бъде покрита с тънък и еднакъв филм.

При експозицията изпитваното вещество се поддържа в контакт с кожата с помощта на пореста марлена превръзка и недразнеща лента. Изпитваното място трябва да бъде допълнително покрито по подходящ начин, така че марлената превръзка и изпитваното вещество да се запазят и животните да не могат да погълнат изпитваното вещество. За да бъде предотвратено поглъщането на изпитваното вещество, могат да се използват ограничаващи средства, но пълно обездвижване не се препоръчва.

В края на експозицията останалото изпитвано вещество трябва да бъде отстранено, когато е възможно, с помощта на вода или друг подходящ метод за почистване на кожата.

Всички животни трябва да бъдат наблюдавани ежедневно и признаците на токсичност да бъдат регистрирани, включително времето им на настъпване, силата и продължителността им. Наблюденията в клетките трябва да включват измененията на кожата и козината, очите и лигавиците, а също дихателната, сърдечно-съдовата, автономната и централната нервна система, соматомоторната активност и начина на поведение. Трябва да се извършват ежеседмични измервания на консумираната храна и животните да се претеглят всяка седмица. Редовните наблюдения на животните са необходими, за да не се губят животни при изпитването поради причини като канибализъм, тъканна автолиза или преместване. В края на периода на изпитването всички оживели животни от несателитните третирани групи се подлагат на аутопсия. Умиращите животни трябва да бъдат отстранени и подложени на аутопсия, когато бъдат забелязани.

На всички животни, включително контролните, обичайно се правят следните прегледи:

- а) Преди експозицията на изпитваното вещество и при преустановяване на изпитването трябва да се проведе офталмологичен преглед с помощта на офталмоскоп или еквивалентно подходящо оборудване, за предпочитане при всички животни, но поне в групите на висока доза и контролните групи. Ако бъдат доловени очни изменения, трябва да бъдат прегледани всички животни.
- б) В края на изпитването трябва да бъде направено хематологично изследване, включващо хематокрита, концентрацията на хемоглобина, броя на еритроцитите, общия брой на левкоцитите и диференциалното им броене и измерване на потенциала за съсирване, например време на съсирване, протромбиново време, тромбoplastиново време или брой на тромбоцитите.

▼B

- в) В края на изпитването трябва да се определят клиничните биохимични параметри на кръвта. Изследвания, които се смятат за целесъобразни при всички изпитвания, са електролитният баланс, въглехидратният метаболизъм и чернодробната и бъбречната функция. Изборът на конкретни изследвания ще се повлияе от наблюденията върху механизма на действие на веществото. Предложени са параметрите калций, фосфор, хлориди, натрий, калий, глюкоза на гладно (с период на гладуване, подходящ за вида), серумна глутамат пируват трансaminaза⁽¹⁾, серумна глутамат оксалоацетат трансaminaза⁽²⁾, орнитин декарбоксилаза, гама глутамил транспептидаза, уреен азот, албумин, креатинин в кръвта, общ билирубин и общ серумен белтък. Други параметри, които може да са необходими за адекватна токсикологична оценка, включват анализ на липиди, хормони, киселинно/алкално равновесие, метхемоглобин и холинестеразна активност. Когато е необходимо да бъде разширено изпитването на наблюдаваните ефекти, може да се използват допълнителни клинични биохимични параметри.
- г) Изследване на урина рутинно не е необходимо, а само когато съществуват показания поради очаквана или наблюдавана токсичност.

Ако историческите изходни данни не са адекватни, трябва да се има предвид определяне на хематологичните параметри и на параметрите на клиничната биохимия преди да започне дозирането.

Макроскопска аутопсия

Всички животни трябва да бъдат подложени на пълна макроскопска аутопсия, която включва преглед на външната повърхност на тялото, всички отвори, и на черепната, гръдната и коремната кухина и съдържанието им. Черният дроб, бъбреците, надбъбречните жлези и тестисите трябва да бъдат претеглени във влажно състояние колкото е възможно по-бързо след дисекцията, за да се избегне изсъхването им. Следните органи и тъкани трябва да бъдат съхранени в подходяща среда за възможно бъдещо хистопатологично изследване: всички макроскопски лезии, мозъкът — включително срези на продълговатия мозък/моста, кората на малкия мозък и главния мозък, хипофизата, щитовидната/паращитовидните жлези, паялата тимусна тъкан (трахеята), белите дробове, сърцето, аортата, слюнчените жлези, черният дроб, слезката, бъбреците, надбъбречните жлези, панкреасът, гонадите, матката, допълнителните полови органи, жлъчният мехур (ако е налице), хранопроводът, стомахът, дванадесетопръстникът, празното черво, хълбочното черво, сляпото черво, ободното черво, правото черво, пикочният мехур, представителен лимфен възел, (женската млечна жлеза), (бедрена мускулатура), периферен нерв, (очи), (гръдна кост с костен мозък), (бедрена кост, включително ставна повърхност), (гръбначен мозък на три нива — шийно, гръдно и поясно) и (извънорбитните слъзни жлези). Тъканите, посочени в скоби, трябва да се изследват само, ако въз основа на признаци на токсичност или ангажиране на целевите органи са налице показания за това.

Хистопатологично изследване

- а) Пълно хистопатологично изследване трябва да се извършва на нормалната и третираната кожа и на органи и тъкани на животни от контролната група и групата на висока доза.
- б) Всички макроскопски лезии трябва да бъдат изследвани.

⁽¹⁾ Сега известна като серумна аланин аминотрансфераза.

⁽²⁾ Сега известна като серумна аспартат аминотрансфераза.

▼B

- в) Целевите органи трябва да бъдат изследвани и в групите на други дози.
- г) Когато се използват плъхове, белите дробове на животните от групите на ниска и междинна доза трябва да бъдат подложени на хистопатологично изследване за признаци на инфекция, тъй като това дава възможност за лесно оценяване на здравословното състояние на животните. При животни от тези групи допълнително хистопатологично изследване може рутинно да не е необходимо, но в групата на висока доза то винаги трябва да се извършва върху органите, при които са налице данни за лезии.
- д) Когато се използва сателитна група, трябва да се прави хистопатологично изследване на тъканите и органите, при които се наблюдават ефекти в другите третирани групи.

2. ДАННИ

Данните трябва да бъдат обобщени в табличен вид, като за всяка изпитвана група са показани броят на животните в началото на изпитването, броят на животните, при които са налице лезии, типът на лезиите и процентът на животните, които демонстрират всеки тип лезия. Резултатите трябва да бъдат оценени с помощта на подходящ статистически метод. Може да се използва всеки признат статистически метод.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Ако е възможно, протоколът от изпитването съдържа следната информация:

- вид, порода, източник, условия на околната среда, диета,
- условия на изпитването,
- нива на дозиране (включително носител, ако е използван) и концентрации,
- данни за токсичния отговор по пол и доза,
- ниво без ефект, където е възможно,
- време на смъртта по време на изпитването или дали животните са оживели до прекратяването му,
- описание на токсичните или други ефекти,
- времето на наблюдение на всеки абнормен признак и неговото последващо развитие,
- данни за храната и телесното тегло,
- резултати от офталмологичното изследване,
- използвани хематологични изследвания и всички резултати,
- използвани клинични биохимични изследвания и всички резултати (включително резултати от всички изследвания на урина).
- резултати от аутопсията,

▼B

- подробно описание на всички резултати от хистопатологичните изследвания,
- статистическа обработка на резултатите, където е възможно,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретиране на резултатите,

3.2. **ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ**

Вижте Общо въведение част Б.

4. **Препратки**

Вижте Общо въведение част Б.

▼ M4**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 равностоен 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 равностоен 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 характеризиране 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 (FOB) 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.

▼ **M4**

4. Разремени 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 подбирани 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 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 ± 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.

▼ **M4****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. 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).

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).

▼ **M4**

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 механизично определени крайни точки, напр. подтискане на холинестеразата от органични фосфати, образуване на метхемоглобин от еритроцитотоксични агенти, тиреоидни хормони (T_3 , T_4) 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 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 подбраните 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 планирания 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.

▼ **M4****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 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 контрол на носителя. 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 носителя.

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 μm и с геометрично стандартно отклонение (σ_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.

▼ **M4****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 ± 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 характеризиране 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

▼ **M4**

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 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).
28. 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

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.

▼ **M4**

30. 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.
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, 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

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.

▼ **M4****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. COHb, CHE 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	Аспаратаминотрансфераза
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).

▼ **M4**

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.

▼ **M4**

Таблица 2

Органи и тъкани, консервирани по време на макроскопската аутопсия

Надбъбречни жлези	Хранопровод
Аорта	[Обонятелна луковица]
Костен мозък (и/или прясно фиксиран аспират)	Яйчници
Мозък (включително части от главния мозък, малкия мозък и моста)	Панкреас
Цекум	Околоштитовидни жлези
Колон	Периферен нерв (седалищен или голямо-пищялен, за предпочитане в непосредствена близост до мускул)
Дванадесетопръстник	Хипофиза
[Епидидими]	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
Сърце	Гръбначен мозък (шийно, гръдно и поясно ниво)
Илеум	Далак
Празно черво	Гръдна кост
Бъбреци	Стомах
[Слезни жлези (клепачни)]	Зъби
Ларинкс (3 равнища, включително основата на епиглотиса)	Тестиси
Черен дроб	Тимус
Бял дроб (всички лобове на едно равнище, включително главни бронхи)	Щитовидни жлези
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 хребтовидната 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
	Матка
	Прицелни органи
	Всички макроскопски увреждания и разраствания на тъканна маса

▼ **M4**

43. Белите дробове следва да се отстранят невредими, да се претеглят и третираат 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 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 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.

▼ **M4**

- 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 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.

▼ **M4**

- 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 (mg/l, mg/m³ 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 (σ_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 пробоземане 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 пробоземането, за разпределението на частиците по размери, и изчисления на MMAD и σ_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).

▼ **M4**

- 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.

▼ M4

- (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, Hameleers 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, етикетирането 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).

▼ M4

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

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

▼ **M4****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 счтено 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.

▼ **M4**

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).

▼ M4

9. При провеждане на изследването за хронична токсичност ръководните принципи и съображенията, формулирани в Ръководство № 19 на ОИСР 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 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.“
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.

▼ **M4****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 половозрели 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 разгледано 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, 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

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

▼ **M4**

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**

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.

▼ M4

21. Освен ако не е ограничено от физичното или химичното естество, или от биологичните ефекти на изпитвания химикал, най-високото ниво на доза обичайно 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 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 разгледани 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 разгледано 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.

▼ M4

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 хранителен 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 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).
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.

▼ M4

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 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 (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 разреждени, 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.

▼ M4

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. Отбелязаните симптоми следва да включват, но не и да се ограничат до промяна в кожата, козината, очите, мукозните мембрани (лигавиците), поява на секреция и екскреция, както и автономна активност (напр. сълзене, 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 третиранията 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 третиранията, 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. Измерванията на консумацията на вода също следва да бъдат предвидени при изследванията, при които питейната активност се изменя.

▼ **M4****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 тромбопластиново 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, глутаматдехидрогеназа, 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 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.

▼ **M4**

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 невротоксичност или имунотоксичност (вж. точка 19). 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.
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 мокрото 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 (клетъчна)	простатна жлеза	щитовидна жлеза
шийка на матката	черен дроб	право черво	[език]

▼ M4

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 луковича]	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.

▼ **M4****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 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;

▼ **M4**

- 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 имуно-токсичност;
- 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.

▼ **M4**

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

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) 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.
- (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.

▼ **M4**

- (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 (ОБ 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.

▼ M4

- (30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (31) (Проект на) документ на Европейска агенция по лекарствата „Клинични 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.

▼ M4

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

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

▼B**Б.31. ИЗПИТВАНЕ ЗА ОЦЕНКА НА ТОКСИЧНОСТТА ЗА ПРЕНАТАЛНОТО РАЗВИТИЕ****1. МЕТОД**

Този метод е еквивалентен на метод ОИСП TG 414 (2001).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Този метод за оценка на токсичността за развитието е разработен с цел да се проучат ефектите на пренаталната експозиция върху бременните опитни животни и върху развиващите се организми *in utero*. Това включва оценка на ефектите върху майките, както и на смъртността, структурните аномалии и отклоненията в растежа на плода. Въпреки че функционалните нарушения представляват съществена проява на токсичността за развитието, тяхната оценка не е предмет на настоящия метод за изпитване. Тя може да се извърши отделно или като допълнение към това изпитване, като се приложи методът за оценка на невротоксичността за развитието. За информация във връзка с изпитването за функционални нарушения и други постнатални ефекти могат да се ползват методите за оценка на репродуктивната токсичност в две поколения и на невротоксичността за развитието.

В отделни случаи може да се наложи този метод да се адаптира въз основа на познанията за специфичните особености на изпитваното химично вещество, например за неговите физико-химични или токсикологични свойства. Внасянето на изменения в метода е допустимо, когато съществуват убедителни научни данни за това, че прилагането на адаптирания метод ще доведе до по-информативни резултати. Научните данни в подкрепа на необходимостта от адаптиране на метода трябва внимателно да се документират в отчета на проучването.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Токсикология на развитието: дял от токсикологията, който изучава неблагоприятните ефекти върху развиващия се организъм в резултат от експозиция преди зачеването, по време на пренаталното развитие или постнатално до настъпването на полова зрялост. Основните прояви на токсичността за развитието включват: 1) смърт на организма; 2) структурни аномалии; 3) промени в растежа; 4) функционални нарушения. В миналото вместо „токсикология на развитието“ често се е използвало названието „тератология“.

Неблагоприятен ефект: всяка промяна спрямо изходното състояние на организма, свързана с прилагането на изпитваното вещество, която води до понижаване жизнеспособността на организма, способността му да се размножава или да се адаптира към околната среда. Неблагоприятните ефекти за развитието в най-широк смисъл обхващат всеки ефект, който нарушава нормалното развитие на организма преди или след раждането.

Нарушение на растежа: промени в масата или размерите на тялото или органите на развиващия се организъм.

Изменения (аномалии): нарушения в развитието на анатомичната структура, които включват малформации и вариации (28).

Малформация/тежка аномалия: структурна промяна, която оказва значителен неблагоприятен ефект върху състоянието на животното (може да бъде и летална) и обикновено настъпва рядко.

▼B

Вариация/незначителна аномалия: структурна промяна, която оказва незначителен неблагоприятен ефект или не оказва неблагоприятен ефект върху състоянието на животното; тя може да бъде преходна и може да се среща сравнително често в контролната популация.

Заченат организъм: термин, с който се обозначава развиващият се организъм през всички етапи от развитието на оплодената яйцеклетка от оплождането до раждането, включително ембрионалния и феталния период; към него се отнасят и екстраембрионалните структури.

Имплантиция (нидация): прикрепването на бластоциста към епителния слой, покриващ маточната кухина, включително проникването на бластоциста през епитела и навлизането му в ендометриума.

Ембрион: организъмът в ранния стадий на развитие след оплождането, по-специално времето от появата на дългата ос до момента, в който са налице всички основни анатомични структури (до края на периода на органогенезата).

Ембриотоксичност: токсичност, свързана с нарушаване на нормалната анатомична структура, развитието, растежа и/или жизнеспособността на ембриона.

Фетус: организъмът в стадия на развитие между края на ембрионалния период и раждането.

Фетотоксичност: токсичност, свързана с нарушаване на нормалната анатомична структура, развитието, растежа и/или жизнеспособността на фетуса.

Аборт: преждевременното изхвърляне на ембриона или нежизнеспособния фетус от матката.

Резорбция: състояние, при което имплантираният в матката плод е загинал и в момента на наблюдението е в процес на резорбция или вече се е резорбирал.

Ранна резорбция: състояние, при което се наблюдават признаци на имплантицията, без да се открива ембрион/фетус.

Късна резорбция: състояние, при което ембрионът или фетусът е загинал и при огледа му се наблюдават външни дегенеративни промени.

NOAEL: съкращение на термина „no-observed-adverse-effect level“ (ниво, при което не се наблюдава неблагоприятен ефект); означава най-високата доза/ниво на експозиция, при които не се наблюдават неблагоприятни ефекти вследствие третирането на организма с дадено химично вещество.

1.3. РЕФЕРЕНТНО ВЕЩЕСТВО

Не се използва.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Обикновено бременните животни се третират с изпитваното вещество най-късно от момента на имплантицията до деня преди датата, за която е планирано убиването им. Тази дата следва да се избере така, че да бъде колкото е възможно по-близо до датата на термина, като в същото време се избегне рискът от загуба на данни в резултат от настъпване на преждевременно раждане. Методът не е предназначен за изследване само на периода на органогенезата (ден 5—15 при гризачи и ден 6—18 при зайци). Проследяват се ефектите през цялата бременност до деня преди извършването на cezарово сечение. Когато е възможно, се обхваща и предимплантационният период. Непосредствено преди извършването на cezарово сечение женските животни се убиват, съдържанието на матката се преглежда и фетусите се изследват за наличие на видими външни аномалии и аномалии на меките тъкани и скелета.

▼B**1.5. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ****1.5.1. Избор на вида опитни животни**

Препоръчва се изпитването да се извърши върху най-подходящия вид животни и да се изберат видове и породи лабораторни животни, които обичайно се използват при изпитвания за оценка на пренаталната токсичност за развитието. Предпочитаният вид гризачи е плъх, а предпочитаният вид опитни животни, който не се отнася към гризачите, е заек. Използването на други животински видове следва да се обоснове.

1.5.2. Условия на отглеждане и хранене

Температурата на помещението, в което се извършва изпитването, следва да бъде 22 °C ($\pm 3^\circ$) за гризачите и 18 °C ($\pm 3^\circ$) за зайците. Стойностите на относителната влажност не следва да бъдат по-ниски от 30 % и е желателно да не превишават 70 %, освен при почистване на помещението. Целта следва да бъде относителната влажност да се поддържа в интервала 50—60 %. Осветлението следва да бъде изкуствено, като се редуват 12 часа светлина и 12 часа тъмнина. При храненето се използват обичайните лабораторни диети с неограничен достъп до питейна вода.

Чифтосването следва да се извърши в клетки, подходящи за целта. За предпочитане е чифтосаните животни да се поставят в индивидуални клетки, но се допуска да се разпределят на малки групи в общи клетки.

1.5.3. Подготовка на опитните животни

Следва да се използват здрави животни, които предварително са се аклиматизирали към лабораторните условия в продължение най-малко на 5 дни и не са подлагани на други изпитвания. Опитните животни следва да се опишат по отношение на вид, порода, източник за доставка, пол, телесна маса и/или възраст. Стойностите на телесната маса и възрастта на животните във всички опитни групи следва да бъдат възможно най-близки. Във всяка опитна група следва да се включат млади, полово зрели, нераждали женски животни. Женските животни следва да се чифтосат с мъжки животни от същия вид и порода, като се избягва чифтосването между животни от едно и също котило. При гризачите за ден 0 на гестацията се приема денят, в който се наблюдава вагинална запушалка и/или сперматозоиди; при зайците за ден 0 се счита най-често денят на коитуса или изкуственото осеменяване в случаите, когато се прилага тази техника. Чифтосаните женски животни следва да бъдат разпределени на принципа на случайния подбор към експонираните групи и контролната група. Клетките следва да бъдат подредени по такъв начин, че да се намалят до минимум възможните ефекти в резултат от разположението им. Всяко животно следва да получи индивидуален идентификационен номер. Чифтосаните женски животни следва да бъдат разпределени чрез случаен подбор към контролната и опитните групи. Когато женските са чифтосани последователно по групи, животните от всяка група следва да се разпределят равномерно между отделните експонирани групи и контролната група. Също така женските, осеменени от едно и също мъжко животно, следва да се разпределят равномерно в отделните групи.

1.6. ПРОЦЕДУРА**1.6.1. Брой и пол на животните**

Експонираните групи и контролната група следва да обхващат достатъчен брой женски животни, така че при аутопсията всяка група да включва приблизително 20 женски животни с места на имплантация. По правило групите не би следвало да наброяват по-малко от 16 животни с места на имплантация. При появата на смъртни случаи сред майките проучването се приема за валидно, когато смъртността не превишава приблизителната граница от 10 %.

▼ B**1.6.2. Подготовка на дозите**

Когато за улесняване на въвеждането се използва носител или друга добавка към изпитваното вещество, следва да се вземат предвид следните възможни ефекти на носителя/добавката: ефекти върху резорбцията, разпределението, метаболизма и ретенцията или екскрецията на изпитваното вещество; ефекти върху химичните свойства на веществото, които могат да повлияят върху токсикологичните му свойства; ефекти върху консумацията на храна и вода или върху хранителния статус на животните. Веществото носител не следва да предизвиква токсични ефекти върху развиващия се организъм или възпроизводителната функция.

1.6.3. Дози

Най-често изпитваното вещество се въвежда всеки ден от момента на имплантацията (напр. от ден 5 след чифтосването) до деня преди датата, за която е определено извършването на цезарово сечение. Когато предварителните проучвания, ако такива са налице, показват, че вероятността от настъпване на предимплантационна смърт не е висока, периодът на третиране може да се разшири и да обхване целия гестационен период от момента на чифтосването до деня преди датата, за която е определено убиването. Известно е, че неправилното отглеждане и провеждане на манипулациите, както и стресът по време на бременността могат да доведат до преждевременна загуба на плода. За да се предотврати загубата на плода в резултат от фактори, които не са свързани с експозицията на изпитваното вещество, следва да се избягват ненужни манипулации върху бременните животни, както и стресът от външни фактори, например шум.

Следва да се приложат най-малко три дози. Успоредно с експонираните групи се наблюдава и нетретирана контролна група. Опитните животни следва да са здрави. Те се разпределят между отделните експонирани групи и контролната група чрез случаен подбор. Дозите следва да бъдат избрани в такова съотношение, че с нарастването им да се наблюдава ясно изразено засилване на токсичните ефекти. С изключение на случаите, когато се налагат ограничения във връзка с физични, химични или биологични свойства на изпитваното вещество, най-високата доза следва да бъде подбрана така, че да води до прояви на токсичност за майката и/или за развиващия се организъм (клинични симптоми или понижение на телесната маса), но не и до смърт или тежко страдание. Най-малко една междинна доза следва да предизвиква минимални наблюдавани токсични ефекти. Най-ниската доза не следва да предизвиква никакви прояви на токсичност за майката или развиващия се организъм. Дозите следва да се подберат в намаляваща последователност по такъв начин, че да се характеризира зависимостта „доза-отговор“ и да се установи нивото, при което не се наблюдава неблагоприятен ефект (NOAEL). В повечето случаи най-подходящо е да се използва двукратно до четирикратно намаление на всяка доза спрямо най-близката по-висока доза. Включването на допълнителна четвърта експонирана група често е за предпочитане пред използването на твърде големи интервали между дозите (напр. намаление повече от 10 пъти). Въпреки че целта на изпитването е определяне на NOAEL за майката, се допускат и случаи, когато това ниво не може да се установи (1).

Нивата на дозите следва да се подберат, като се вземат под внимание всички съществуващи токсикологични данни, както и информацията за метаболизма и токсикокинетиката на изпитваното вещество или на подобни вещества. Тази информация се използва също и при обосновката на схемата на третиране. Заедно с експонираните групи следва да се използва и контролна група. На животните от тази група се въвежда вода или носител, когато се използва такъв. Изпитваното вещество или носителят се въвеждат в един и същи обем при всички групи. Животните в контролната група/групи следва да се поставят при същите условия и да се подлагат на същите манипулации както тези от експонираните групи. Носителят следва да се въвежда на животните от контролната група в най-голямото количество, което се въвежда на експонираните животни (количеството, с което се въвежда най-ниската доза от изпитваното вещество).

▼B**1.6.4. Лимитиращо изпитване**

Когато изпитването върху една експонирана група с орална дневна доза, равна или по-висока от 1 000 mg/kg т.м., извършено съгласно процедурите, описани в настоящия метод, не предизвика наблюдавани признаци на токсичност както при бременните животни, така и при тяхното поколение, или когато при тази или по-високи дози не се очаква поява на токсичен ефект въз основа на съществуващи данни (напр. за структурни аналози или за вещества с подобен метаболизъм), тогава извършването на изпитването в пълен обем с три различни дози може да се прецени като ненужно. Във връзка с очакваните нива на експозиция за населението може да се наложи необходимостта от използване на по-високи орални дози в лимитиращото изпитване. При други пътища на въвеждане, напр. инхалаторно или дермално, физикохимичните свойства на изпитваното вещество често могат да повлияят и да ограничат максимално възможното ниво на експозиция (например дермалната апликация не следва да предизвиква силно изразена локална токсичност).

1.6.5. Въвеждане на дозите

Изпитваното вещество или носителят обикновено се въвеждат орално чрез гаваж. Когато се използва друг път на въвеждане, изборът следва да се обоснове. В този случай може да се наложи въвеждането на модификации в представения метод (2)(3)(4). Изпитваното вещество следва да се въвежда приблизително по едно и също време всеки ден.

Количеството от веществото, което се въвежда на всяко животно, се изчислява спрямо последното измерване на телесната маса. Въпреки това, когато третирането се извършва през последната третина на бременността, следва да се подхожда предпазливо при изчисляване на количеството. За да се избегне силно изразен токсичен ефект върху майките, при избора на дозите следва да се използват съществуващите данни за веществото. Когато при бременните животни се наблюдават симптоми на тежка интоксикация, те следва да бъдат умъртвени по хуманен начин. Ако няколко бременни животни показват симптоми на тежка интоксикация, следва да се прецени дали е необходимо всички животни от тази опитна група да бъдат умъртвени по хуманен начин. Когато веществото се въвежда чрез гаваж, се препоръчва въвеждането да се извършва веднъж дневно посредством стомашна сонда или подходяща интубационна канюла. Максималният обем течност, който може да бъде въведен еднократно, зависи от телесната маса на опитното животно. Обемът не следва да превишава 1 ml/100 g т.м., освен в случаите, когато се прилагат водни разтвори. Тогава обемът може да достигне 2 ml/100 g т.м. Когато се използва царевично олио като носител, обемът не следва да превишава 0,4 ml/100 g т.м. За да се осигури въвеждането на веществото в постоянен обем при всички използвани дози, промените в обема следва да бъдат сведени до минимум, като вместо него се променят концентрациите.

1.6.6. Наблюдения върху бременните животни

Клиничните наблюдения следва да се извършват и да се отразяват в документацията на изпитването най-малко един път дневно, за предпочитане всеки ден по едно и също време, като се вземе под внимание периодът след третирането, когато се очаква появата на най-силно изразени ефекти. Състоянието на животните следва да се описва, като се отразяват смъртността, наличието на животни в терминално състояние, промените в поведението и всички прояви на ясно изразено токсично действие.

1.6.7. Телесна маса и консумация на храна

Животните следва да се претеглят в ден 0 от гестационния период (в случаите когато осеменените животни са доставени от външен снабдител — не по-късно от ден 3 от гестацията), както и в деня, когато започва третирането, най-малко на всеки 3 дни по време на експозицията и в деня, за който е насрочено убиването.



Количеството на консумираната храна следва да се отчита и записва на всеки три дни, в същите дни, когато се измерва телесната маса.

1.6.8. **Макроскопски оглед при аутопсиране**

Женските животни следва да се убият един ден преди очакваната дата на раждането. Женските животни, показващи признаци на аборт или преждевременно раждане преди деня, за който е насрочено убиването, следва да бъдат убити и подложени на цялостен макроскопски оглед.

В момента на убиването или при настъпването на смърт по време на изпитването следва да се извърши макроскопски оглед на женските животни, за да се установи наличието на структурни аномалии или други патологични промени. Препоръчва се огледът на бременните животни по време на цезаровото сечение и огледът на фетусите да се извършат, без да се знае към коя група се отнасят майките и фетусите, за да не се отрази това върху наблюденията и оценките.

1.6.9. **Оглед на съдържанието на матката**

Веднага след убиването или възможно най-скоро след настъпване на смъртта матките следва да бъдат извадени и да се потвърди наличието на бременност. Когато видът на матката показва отсъствие на бременност, тя следва да се изследва по-подробно (напр. чрез оцветяване с амониев сулфид при гризачи и оцветяване по Salewski или друг подходящ метод при зайци), за да се потвърди, че животното не е бременно (5).

Матките на бременните животни, включително цервиксът, следва да бъдат претеглени. Не е необходимо да се измерва масата на матките на бременни животни, умрели по време на проучването.

За всяко бременно животно следва да се определи броят на жълтите тела.

Съдържанието на матката следва да се прегледа, за да се установи броят на мъртвите ембриони/фетуси и на живите фетуси. Следва да се опише степента на резорбция, за да се установи приблизителното време на смъртта на умрелите ембриони/фетуси (вж. точка 1.2).

1.6.10. **Оглед на фетусите**

При огледа на всеки фетус следва да се определи полът и да се измери телесната маса.

Всеки фетус следва да се прегледа за наличие на външни аномалии (6).

Фетусите следва да се огледат за наличие на изменения в скелета и меките тъкани (напр. вариации и малформации или аномалии) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Препоръчва се да се извърши категоризиране на наблюдаваните изменения, но това не се изисква задължително. Когато се извършва категоризиране, следва ясно да се посочат критериите, отнасящи се за всяка категория. Особено внимание при огледа следва да се обърне на състоянието на половата система и да се търсят признаци за нарушение в развитието ѝ.

Когато изпитването се извършва върху гризачи, приблизително половината от фетусите във всяко котило следва да бъдат обработени и изследвани за наличие на скелетни аномалии. Останалите фетуси следва да се обработят и изследват за наличие на изменения в меките тъкани посредством утвърдени или подходящи методи за серийно сециране или прецизни секционни техники за макроскопски оглед.

▼B

Когато изпитването се извършва върху животни, които не са гризачи, например върху зайци, всички фетуси следва да се прегледат за наличие на изменения както в меките тъкани, така и в скелета. Огледът на тези фетуси се извършва чрез внимателна дисекция, при която се търсят изменения в меките тъкани. Дисекцията може да включва и процедури, чрез които се изследва по-подробно устройството на сърцето (25). При огледа главите на половината от фетусите следва да се отделят, обработят и изследват за наличие на изменения в меките тъкани (включително очи, мозък, носни кухини и език) посредством стандартни методи за серийно сециране (26) или други методи с подобна чувствителност. Телата на всички фетуси следва да се обработят и огледат за наличие на скелетни аномалии посредством същите методи както тези, които се прилагат при гризачите.

2. ДАННИ

2.1. ПРЕДСТАВЯНЕ И ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Данните следва да се представят индивидуално както за бременните животни, така и за тяхното поколение, и да се обобщат в табличен вид, като за всяка опитна група и за всяко поколение се посочат броят на животните в началото на изпитването, броят на животните, умрели по време на изпитването или умъртвени по хуманни съображения, и времето на настъпване на смъртта или на умъртвяването, броят на бременните женски животни, броят на животните със симптоми на токсично действие, характеристиката на наблюдаваните симптоми, включително време на поява, продължителност и степен на изразеност, наблюдения върху ембрионите и фетусите, както и всички необходими данни за котилата.

Количествените резултати следва да се оценят чрез подходящи статистически методи, като котилото се използва като единица за наблюдение при анализа на данните. Следва да се приложат общоприети статистически методи. Подборът на статистическите методи следва да се направи в зависимост от дизайна на проучването и да се обоснове. Данните за животни, които не са преживели до датата на убиването, също следва да се представят в отчета за изпитването. Тези данни могат да се включат при изчислението на средногруповите стойности на изследваните показатели, когато това е възможно. Информативността на данните за тези животни и съответно включването или изключването им при изчислението на средногрупови стойности следва да се прецени за всеки отделен случай и да се обоснове.

2.2. ОЦЕНКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Оценката на резултатите от проучването на пренаталната токсичност за развитието се извършва въз основа на наблюдаваните ефекти. Оценката включва следните данни:

- резултати от изпитването по отношение на майките и ембрионите/фетусите, включително оценка на зависимостта (или отсъствието на такава) между експозицията на изпитваното вещество и честотата и тежестта на всяка от наблюдаваните промени;
- критерии за категоризиране на измененията във външния вид, скелета и меките тъкани на фетусит, в случаите, когато е извършено категоризиране;

▼B

- когато е необходимо, следва да се представят данни за контролни групи от предишни изпитвания (историческа контрола), за да се подпомогне интерпретацията на резултатите от настоящото изпитване;
- стойностите, използвани при изчислението на индекси или на относителни дялове (в проценти);
- адекватен статистически анализ на резултатите от изпитването, където това е необходимо; следва да се даде достатъчно информация за използваните методи, така че анализът да може да се възпроизведе и оцени от независим рецензент/статистик.

Във всяко проучване, при което се установява отсъствие на каквито и да е токсични ефекти, е необходимо да се прецени необходимостта от допълнителни изследвания за определяне степента на резорбция и съдържанието на изпитваното вещество в организма на третираните животни.

2.3. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Изпитването за оценка на пренаталната токсичност за развитието следва да даде информация за ефектите върху бременните животни и върху вътреутробното развитие на тяхното потомство при многократно постъпване на дадено химично вещество по време на бременността. Резултатите от него следва да се интерпретират във връзка с данните от изпитванията за оценка на субхроничната токсичност, репродуктивната токсичност, токсикокинетиката и др. Тъй като при изпитването се оценява както системната токсичност за майката, така и токсичността за развиващия се организъм, резултатите позволяват до известна степен да се разграничат ефектите върху развиващия се организъм, които се явяват при отсъствие на прояви на системна токсичност, от ефектите, които се предизвикват само при нива, токсични и за майката (27).

3. ДОКЛАДВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

3.1. ОТЧЕТ ЗА ИЗПИТВАНЕТО

Отчетът за изпитването следва да включва следната информация:

Изпитвано вещество:

- физична природа и, където е необходимо, физикохимични свойства;
- данни за идентифициране на химичното вещество, включително CAS номер, ако такъв е известен/определен;
- степен на чистота на веществото.

Носител (когато се използва такъв):

- обосновка за използването на носител, когато носителят не е вода.

Опитни животни:

- вид и порода на използваните опитните животни;
- брой и възраст на опитните животни;
- източник за доставка на животните, условия на отглеждане, диета и т.н.;
- телесна маса на всяко животно в началото на изпитването.

Условия на провеждане на изпитването:

- обосновка за избора на дозите;
- описание на подготовката на изпитваното вещество за въвеждане (приготвяне на формулация или включване в диетата), използвани концентрации, стабилност и хомогенност на формулацията;

▼B

- описание на въвеждането на изпитваното вещество;
- преизчисляване на концентрациите на изпитваното вещество в диетата/питейната вода (ppm) в дневни дози (mg/kg т.м.), където това е приложимо;
- условия на средата, в която се провежда изпитването;
- критерии за качество, на които отговарят храната и водата за пиене.

Резултати:

Данни за отговора във връзка с токсичността за майката в зависимост от приложената доза — данните включват, но не се ограничават само до:

- брой на животните в началото на изпитването, брой на животните, преживели до края на изпитването, брой на бременните животни, брой на животните с аборт и преждевременно раждане;
- за всяко животно се отбелязва дали е преживяло до деня на убиването; за тези, които не са преживели, се отбелязва денят на смъртта;
- данните за животните, които не са преживели до деня на планираното убиване, следва да се представят, но не следва да се използват при статистическия анализ за сравнение между групите;
- дата на появата на всеки клиничен симптом; проследяване на по-нататъшното му развитие;
- телесна маса, прираст на телесната маса и маса на бременната матка, включително, по желание, коригиране на прираста на телесната маса спрямо масата на бременната матка;
- данни за консумацията на храна; представят се и данните за консумацията на вода, ако тя е измерена;
- данни от аутопсията, включително маса на матката;
- следва да се посочат стойностите на NOAEL за ефектите върху майката и развиващия се организъм.

Ефекти върху развиващия се организъм при всяка доза за котилата, при които се установява наличие на имплантации, включително:

- брой на жълтите тела;
- брой на имплантациите, брой и относителен дял (като %) на живите и мъртвите фетуси и на резорбциите;
- брой и относителен дял на пред- и постимплантационните загуби.

Ефекти върху развиващия се организъм при всяка доза за котилата с живи фетуси, включително:

- брой и относителен дял на живите новородени;
- съотношение между броя на фетусите от всеки пол;
- фетална телесна маса, за предпочитане както поотделно за всеки пол, така и общо за двата пола;
- малформации, засягащи външния вид, скелета и меките тъкани, и други изменения;
- критерии за категоризиране, когато това е необходимо;

▼B

— общ брой и относителен дял на фетусите и котилата с видими външни аномалии и аномалии на скелета и меките тъкани; характеристика на наблюдаваните аномалии и други изменения по вид и честота.

Обсъждане на резултатите.

Изводи.

4.

ПРЕПРАТКИ

- (1) Kavlock R. J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399—410.
- (2) Kimmel, C. A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386—398.
- (3) Wong, B. A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CUT Activities* 17; 1—8.
- (4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.
- (5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterus der Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.
- (6) Edwards, J. A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D. H. M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.
- (7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171—173.
- (8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; 381—391.
- (9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47: 229—242.
- (10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.
- (11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291—306.
- (12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits as Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313—320.
- (13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; 398—408.
- (14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309—316.
- (15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169—181.

▼B

- (16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual*, pp. 163—173.
- (17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411—445.
- (18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61—63.
- (19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (*Mus Norvegicus Albinus*) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313—355.
- (20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181—188.
- (21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.
- (22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques*, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251—277.
- (23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.
- (24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233—239.
- (25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37—38.
- (26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126—144.
- (27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798—63826.
- (28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) *Teratology* 55; 249—292.

▼ M4

B.32. ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА КАНЦЕРОГЕННОСТ

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоеен на Указание за изпитване 451 на ОИСР (ОИСР TG 451) (2009 г.). Първоначалното Указание за изпитване 451 е прието през 1981 г. Разработването на този преработен метод B.32 беше сметено 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 B.32 е проведено успоредно с преразглеждането на глава B.30 („Изследване за хронична токсичност“) и глава B.33 от настоящото приложение („Комбинирани изследвания 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 B.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 B.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 ОИСР № 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 указанията на ОИСР за прилагане на изпитвани химикали по дермален (7) и инхалационен път (7) (8). Глава B.8 от настоящото приложение (9) и глава B.29 от настоящото приложение (10), заедно с Ръководство на ОИСР за изпитване за остра инхалаторна токсичност (8), следва специално да бъдат консултирани при планирането на по-дългосрочни проучвания, включващи експозиция по инхалационен път. Глава B.9 от настоящото приложение (11), следва да бъде консултирана в случай на изпитване, провеждано по дермален път.

▼ M4

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,
 - характеризирание 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

▼ M4

от други изследвания с повтаряща се експозиция. Оценка 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 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 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.

▼ **M4**

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 разгледано, 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 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 (± 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

▼ **M4**

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).

▼ **M4****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 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.
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 разгледани 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 разгледано 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.,

▼ M4

- 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 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).
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.

▼ **M4**

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.

▼ **M4****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 третия ден, 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 химикалт 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 измервания

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 счтено 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, гърдната 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.

▼ M4

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 (клетъчна)	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	гърбначен мозък (на три нива: шийно, гръдно и поясно ниво)	[уретра]
[бедрена кост и става]	[обонятелна луковича]	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.

▼ **M4***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;

▼ **M4**

— 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);

▼ **M4***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, 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;

*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.

▼ **M4**

- (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.
- (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.

▼ M4

- (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 (ОБ 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.

▼ M4

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

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

▼ M4

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.

▼ **M4**

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 обстояйни 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,
 - характеризирание 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

▼ M4

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 ОИСР 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 умъртено 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 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—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).

▼ **M4**

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 разгледано, 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 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. 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.

▼ **M4****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 ± 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

▼ M4

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 определяния. 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 за 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, 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 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 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.

▼ M4

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 избрано 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 пониски 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 разгледано 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,

▼ M4

- 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 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).
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.

▼ M4

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 обикнено 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 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 разреждени, 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 обикнено 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 обикнено 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):

▼ M4

- 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 извършваните наблюдения 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. Отбелязаните симптоми следва да включват, без да се ограничат само до промяна в кожата, козината, очите, лигавиците, поява на секреция и екскреция, 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 поддържане 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.

▼ M4

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 третия ден, 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 определяния (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 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 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

▼ **M4**

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 ⁽¹⁾. 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, аспаргатаминотрансфераза, 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, 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 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.

⁽¹⁾ 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 по-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 предвидят за различен ден от пробовземането за клиничната биохимия.

▼ M4

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	гърбначен мозък (на три нива: шийно, гърдно и поясно ниво)	[уретра]
[бедрена кост и става]	[обонятелна луковича]	далак	влагалище
жлъчен мехур (за видове, различни от плъх)	яйчници	[гърдна кост]	срез от костен мозък и/или костномозъчен аспират, прясно фиксиран
Хардцова жлеза			

▼ **M4**

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 преглеждани 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.

▼ M4

Хематология, клинична биохимия и други измервания

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 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.
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	стомаш (предстомаш, жлезист стомаш)
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 (клетъчна)	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

▼ M4

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 луковича]	далак	влагалище
жлъчен мехур (за видове, различни от плъх)	яйчници	[гръдна кост]	срез от костен мозък и/или костномозъчен аспират, прясно фиксиран
Хардерова 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.

▼ **M4****ДАННИ 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.

▼ **M4***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 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,

▼ **M4**

- 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
- 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.
- (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)“).

▼ **M4**

- (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.

▼ M4

- (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.

▼ M4

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

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

▼B**Б.34. ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ЗА РАЗМНОЖАВАНЕТО В ЕДНО ПОКОЛЕНИЕ****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Вижте Общо въведение част Б.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Вижте Общо въведение част Б.

1.3. Вещества за сравнение

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Изпитваното вещество се прилага в нарастващи дози върху няколко групи мъжки и женски животни. Мъжките животни трябва да бъдат дозирани по време на растежа и в продължение на поне един пълен цикъл на сперматогенеза (приблизително 56 дни при мишки и 70 дни при плъхове), за да бъдат предизвикани евентуални нежелани ефекти на изпитваното вещество върху сперматогенезата.

Женските животни от родителското поколение (Р) трябва да бъдат дозирани с изпитваното вещество в продължение на поне два пълни цикъла на разгонване. След това животните се чифтосват. Изпитваното вещество се прилага и при двата пола по време на чифтосването и след това само при женските животни през бременността и по време на кърменето. Този метод ще изисква модифициране за прилагане чрез инхалиране.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ*Подготовка*

Преди изпитването здрави млади животни се избират по случаен признак и се разпределят в третирана и контролна група. Животните се държат при експериментални условия на настаняване и хранене в продължение поне на пет дни преди изпитването. Препоръчва се изпитваното вещество да се прилага с храната или в питейната вода. Приемливи са и други начини на прилагане. Дозирането при всички животни трябва да се извършва по един и същ метод по време на съответния експеримент. Ако за улесняване на дозирането се използват помощно вещество или други добавки, трябва да е известно, че те не водят до токсични ефекти. Дозирането трябва да бъде седем дни в седмицата.

▼B**Експериментални животни***Избор на вид*

Предпочитаните видове са плъх или мишка. Трябва да се използват здрави животни, които в миналото не са били подлагани на експериментални процедури. Не трябва да се използват породи с ниска плодовитост. Експерименталните животни трябва да бъдат характеризирани по отношение на вида, породата, пола, теглото и/или възрастта.

За адекватна оценка на плодовитостта трябва да бъдат изследвани както мъжки, така и женски животни. Всички експериментални и контролни животни трябва да бъдат отбити преди започването на дозирането.

Брой и пол

Всяка третирана контролна група трябва да се състои от достатъчен брой животни, за да се получат 20 бременни женски животни на или около термин.

Целта е да се получат достатъчно на брой бременности и потомство, за да се осигури значима оценка на потенциала на веществото да влияе върху плодовитостта, бременността и майчиното поведение при животните от поколение P, както и сученето, растежа и развитието на поколението F₁ от зачеването до отбиването.

Условия на изпитването

Храна и вода трябва да се предоставят *ad libitum*. Около раждането бременните женски трябва да бъдат настанени в индивидуални клетки за родилки и майки и могат да им бъдат предоставени материали за гнездо.

Нива на дозиране

Трябва да се използват поне три третирани групи и контролни групи. Ако за прилагане на изпитваното вещество се използва носител, контролната група трябва да получава най-голямото използвано количество носител. Ако изпитваното вещество предизвиква намаляване на приема или усвояването на храната, тогава може да се сметне за необходимо използването на втора контролна група за храненето. В идеалния случай, освен ако няма ограничение поради физичното/химичното естество или биологичните ефекти на изпитваното вещество, най-високото ниво на дозиране трябва да предизвика токсичност, но не и смъртност при животните от родителското (P) поколение. Междинната доза(и) трябва да предизвиква минимални токсични ефекти, дължащи се на изпитваното вещество, а ниската доза не трябва да предизвиква никакви видими нежелани ефекти върху родителите или поколението. Когато е прилагана със сонда или капсули, даваната на всяко животно доза трябва да се базира на индивидуалното телесно тегло на всяко животно и да се коригира ежеседмично към измененията на телесното тегло. По желание, за женските животни по време на бременността дозите могат да се базират на телесното тегло на ден 0 или 6 от бременността.

Гранично изпитване

При вещества с ниска токсичност, ако доза, която е поне 1 000 mg/kg, не води до поява на признаци на повлияване на репродуктивната функция, изпитвания с други дози може да не се смятат за необходими. Ако предварителното изпитване при високо ниво на дозиране ниво с явни данни за майчина токсичност, не показва нежелани ефекти върху плодовитостта, изпитвания при други нива на дозиране може да не се смятат за необходими.



Провеждане на изпитването

Експериментални схеми

Ежедневното дозиране на мъжките животни от родителското поколение (P) трябва да започне, когато те са на около пет до девет седмична възраст, след като са отбити и са аклиматизирани в продължение на поне пет дни. При плъхове дозирането продължава 10 седмици преди периода на чифтосване (за мишки периодът е осем седмици). Мъжките животни трябва да бъдат убити и изследвани в края на чифтосването, или, алтернативно, мъжките могат да бъдат задържани на експерименталната диета за евентуално получаване на второ котило и трябва да бъдат убити и изследвани преди края на изпитването. За женските животни от родителското поколение (P) дозирането трябва да започне след най-малко пет дни аклиматизиране в продължение на поне две седмици преди чифтосването. Ежедневното дозиране при женските животни от поколението P трябва да продължи през целия триседмичен период на чифтосване, бременност и до отбиването на поколението F₁. Трябва да се има предвид модифициране на схемата за дозиране на базата на друга съществуваща информация за изпитваното вещество, като стимулиране на метаболизма или биоакмулиране.

Процедура за чифтосване

При изпитвания за токсичност за размножаването може да се използва чифтосване в съотношение 1:1 (едно мъжко за едно женско животно), или 1:2 (едно мъжко за две женски животни).

При чифтосване 1:1 едно женско животно трябва да се оставя с едно и също мъжко животно до настъпване на бременност или до изтичането на три седмици. Всяка сутрин женските животни трябва да бъдат прегледани за наличие на сперма или вагинални запушалки. Ден 0 на бременността се определя като деня, в който са открити вагинална запушалка или сперма.

Двойките, които не успеят да се чифтосат, трябва да бъдат оценени за определяне на причината за предполагаемото безплодие.

Това може да включва процедури като предоставяне на допълнителни възможности за чифтосване с други мъжки и женски животни с доказана оплодителна способност, микроскопско изследване на репродуктивните органи и изследване на цикъла на разгонване или сперматогенезата.

Големина на котилото

На животните, дозирани при изпитване за плодовитост, се дава възможност да родят потомството си нормално и да го отгледат до етапа на отбиване без стандартизиране на котилото.

Когато се извършва стандартизиране, се препоръчва следната процедура. Между ден 1 и 4 след раждането големината на всяко котило може да бъде коригирана посредством елиминиране на излишните новородени животни чрез селекция, за да се получат, колкото е възможно по-точно, четири мъжки и четири женски животни за котило.

Когато броят на мъжките или женските новородени животни не дава възможност да се получат по четири животни от пол за котило, приемлива е частична корекция (например, пет мъжки и три женски). Корекция не се прави при котила, състоящи се от по-малко от осем новородени животни.

▼B**Наблюдения**

По време на изпитването всяко животно трябва да се наблюдава поне един път дневно. Трябва да се регистрират съответните изменения в поведението, признаците за затруднено или продължително раждане и всички признаци на токсичност, включително и смъртност. През времето преди чифтосването и по време на чифтосването, консумацията на храна трябва ежедневно да се измерва. След раждането и по време на лактацията измерванията на консумацията на храна (и на консумацията на вода, когато изпитваното вещество се прилага в питейната вода) трябва да се извършват в същия ден като претеглянето на котилото. Мъжките и женските животни от поколението Р трябва да бъдат претеглени през първия ден на дозирането и след това един път седмично. Тези наблюдения трябва да се провеждат за всяко възрастно животно поотделно.

Продължителността на бременността трябва да се изчислява от ден 0 на бременността. Всяко котило трябва да бъде прегледано възможно най-скоро след раждането, за да се установят броят и полът на новородените животни, мъртвородените, живородените и наличието на макроскопски аномалии.

Мъртвите новородени и новородените, които са умъртвени на ден 4, трябва да бъдат съхранени и изследвани за възможни дефекти. Живите новородени животни трябва да бъдат преброени и котилата да бъдат претеглени на сутринта след раждането и на 4-ти и 7-и ден и след това всяка седмица до прекратяване на изпитването, когато животните трябва да бъдат претеглени индивидуално.

Трябва да се регистрират физическите и поведенческите аномалии, наблюдавани при майките и потомството.

*Патологично изследване***Аутопсия**

При умъртвяването или смъртта по време на изпитването, животните от поколение Р трябва да бъдат изследвани макроскопски за структурни аномалии или патологични изменения, като се обръща специално внимание на органите от размножителната система. Мъртвите или умиращи новородени животни трябва да бъдат изследвани за дефекти.

Хистопатологично изследване

Яйчниците, матката, шийката, влагалището, тестисите, надсеменниците, семенните мехурчета, простатната жлеза, коагулиращата жлеза, хипофизната жлеза и целевите орган(и) на всички животни от поколение Р трябва да бъдат съхранени за микроскопско изследване. В случай че тези органи не са изследвани при други изпитвания с многократни дози, те трябва да бъдат изследвани микроскопски при всички животни на висока доза, при контролните животни и при животните, които умират по време на изпитването, ако е възможно.

Органите, в които при тези животни се наблюдават аномалии, трябва след това да бъдат изследвани при всички други животни от поколение Р. В тези случаи трябва да се направи микроскопско изследване на всички тъкани, при които се наблюдават макроскопски патологични изменения. Както е предложено в процедурите за чифтосване, размножителните органи на животните, при които има съмнение за безплодие, могат да бъдат подложени на микроскопско изследване.

▼ B**2. ДАННИ**

Данните могат да бъдат обобщени в табличен вид, като за всяка изпитвана група са показани броят на животните в началото на изпитването, броят на фертилните мъжки животни, броят на бременните женски животни, типовете промени и процентът на животните, които демонстрират всеки тип промяна.

Когато е възможно, числовите резултати трябва да бъдат оценени с помощта на подходящ статистически метод. Може да се използва всеки признат статистически метод.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Ако е възможно, протоколът от изпитването съдържа следната информация:

- използван вид/порода,
- данни за токсичния отговор по пол и доза, включително плодовитост, бременност и жизнеспособност,
- време на смъртта по време на изпитването или дали животните оживяват до времето на планираното пожертване или до прекратяване на изпитването,
- таблица, представяща теглото на всяко котило, средното тегло на новородените животни и индивидуалните тегла на новородените животни при прекратяване на изпитването,
- токсичните или други ефекти върху размножаването, потомството и постнаталния растеж,
- деня на наблюдение на всеки абнормен признак и неговото последващо развитие,
- данни за телесното тегло за животните от поколение P,
- резултати от аутопсията,
- подробно описание на всички резултати от микроскопските изследвания,
- статистическа обработка на резултатите, където е необходимо,
- обсъждане на резултатите,
- интерпретиране на резултатите.

3.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАН

Вижте Общо въведение част Б.

4. ПОЗОВАВАНИЯ

Вижте Общо въведение част Б.



Б.35. ИЗПИТВАНЕ ЗА РЕПРОДУКТИВНА ТОКСИЧНОСТ В ДВЕ ПОКОЛЕНИЯ

1. МЕТОД

Този метод е еквивалентен на метод ОИСП TG 416 (2001).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Този метод за оценка на репродуктивната токсичност в две поколения е разработен с цел да се проучат ефектите на изпитваното вещество върху състоянието и функцията на женската и мъжката полова система, включително функцията на гонадите, естралния цикъл, поведението при чифтосване, зачеването, бременността, раждането, лактацията и отбиването, както и върху растежа и развитието на потомството. Също така чрез това изпитване се получава информация за ефектите на изпитваното вещество върху неонаталната болестност и смъртност, както и предварителни данни за пренаталната и постнаталната токсичност за развитието. Данните, получени от това изпитване, дават насока за провеждането на по-нататъшни изпитвания. Освен растежа и развитието на поколение F1 посредством този метод се оценяват състоянието и функцията на женската и мъжката полова система, както и растежът и развитието на поколение F2. По-нататъшна информация за токсичността за развитието и функционалните нарушения може да се получи, като към протокола на този метод се включат допълнителни процедури, взаимствани от методите за оценка на токсичността за развитието и/или невротоксичността за развитието, когато това е необходимо. Тези ефекти могат да се изследват и в отделни проучвания, като се приложат съответните методи.

1.2. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Изпитваното вещество се въвежда в различни дози на няколко групи мъжки и женски животни. Мъжките животни от родителското поколение (поколение P) трябва да се третират по време на растежа и в продължение на най-малко един пълен цикъл на сперматогенеза (приблизително 56 дни при мишки и 70 дни при плъхове), за да се установят неблагоприятните ефекти върху сперматогенезата. Ефектите върху сперматозоидите се откриват чрез изследване на редица параметри (напр. морфология и подвижност на сперматозоидите), както и чрез подробно хистопатологично изследване на тъканини препарати. Ефектите върху мъжките животни от поколение P не е необходимо да се оценяват, когато съществуват данни за сперматогенезата от предишни проучвания при многократно постъпване на изпитваното вещество за достатъчно продължителен период, например данни от 90-дневно изпитване. Въпреки това се препоръчва да се съхранят проби от сперматозоидите от поколение P или техните дигитални образи, за да може по-късно да се извърши оценка, ако е необходимо. Женските животни от поколение P трябва да се третират по време на растежа, както и в продължение на няколко пълни естрални цикъла, за да се установят неблагоприятните ефекти на изпитваното вещество върху нормалното протичане на естралния цикъл. Изпитваното вещество се въвежда на животните от родителското (P) поколение по време на чифтосването и настъпилата в резултат от това бременност, както и след раждането до отбиването на потомството им (поколение F1). След отбиването веществото започва да се въвежда на животните от поколение F1 по време на техния растеж до достигане на полова зрялост, чифтосването и възпроизводството им до отбиването на потомството им (поколение F2).

При всички животни се провежда клинично наблюдение и патологоанатомично изследване за установяване на токсични ефекти, като особено внимание се обръща върху състоянието и функцията на мъжката и женската полова система и върху растежа и развитието на потомството.

▼B**1.3. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ****1.3.1. Избор на вида опитни животни**

Предпочитаният вид опитни животни е плъх. Използването на други животински видове трябва да се обоснове. В тези случаи се налага да се внесат съответни модификации в метода за изпитване. Не трябва да се използват породи с ниска плодовитост или породи, за които е характерна висока честота на вродените аномалии. Различията в индивидуалните стойности на телесната маса на животните в началото на проучването трябва да бъдат минимални и да не превишават 20 % от средната телесната маса за всяка група по пол.

1.3.2. Условия на отглеждане и хранене

Температурата във вивариума трябва да бъде 22 °C ($\pm 3^\circ$). Стойностите на относителната влажност не трябва да бъдат по-ниски от 30 % и е желателно да не превишават 70 % освен при почистване на помещението. Целта трябва да бъде относителната влажност да се поддържа в интервала 50—60 %. Осветлението трябва да бъде изкуствено, като се редуват 12 часа светлина и 12 часа тъмнина. За храненето се използват обичайните лабораторни диети при неограничен достъп до вода за пиене. В определени случаи изборът на диетата може да зависи от това, че е необходимо веществото да се смеси по подходящ начин и да се въведе с храната.

Животните могат да се поставят в индивидуални клетки или да се разпределят на малки групи от един и същи пол в общи клетки. Чифтосването трябва да се извърши в клетки, подходящи за тази цел. След като се открият признаците на копулация, чифтосаните женски животни трябва да се поставят в индивидуални клетки, подходящи за раждане или отглеждане на малките. Друга възможност е чифтосаните плъхове да се разпределят в малки групи и да се отделят в самостоятелни клетки един или два дни преди раждането. Когато наближи раждането, в клетките на бременните животни трябва да бъдат поставени подходящи материали за гнездо.

1.3.3. Подготовка на опитните животни

Трябва да се използват здрави млади животни, които предварително са се аклиматизирали към лабораторните условия в продължение най-малко на 5 дни и не са подлагани на други изпитвания. Опитните животни трябва да се опишат по отношение на вид, порода, източник за доставка, пол, телесна маса и/или възраст. Трябва да се знае кои животни са от едно и също котило, за да се избегне чифтосването между тях. Животните трябва да бъдат разпределени на принципа на случайния подбор към контролната или експонираните групи (препоръчва се да се извърши стратифициране по телесна маса). Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че да се намалят до минимум ефектите, които биха могли да възникнат в резултат от разположението им. Всяко животно трябва да бъде обозначено с индивидуален идентификационен номер. Животните от поколение P се номерират, преди да започне третирането с изпитваното вещество. Животните от поколение F1, които са избрани за чифтосване, се номерират при отбиването им. В документацията на изпитването трябва да се обозначи от кое котило произлиза всяко от избраните за чифтосване F1 животни. Освен това във връзка с измерването на индивидуалната телесна маса или провеждането на функционални изследвания се препоръчва новородените да получат индивидуална идентификация възможно най-скоро след раждането.

Животните от родителското (P) поколение трябва да бъдат на възраст 5—9 седмици в началото на третирането. Стойностите на телесната маса и възрастта на всички животните в опитните групи трябва да бъдат възможно най-близки.

▼B**1.4. ПРОЦЕДУРА****1.4.1. Брой и пол на животните**

Контролната група и всички експонирани групи трябва да включват достатъчно голям брой животни, тъй като е желателно по време на раждането или близо до термина броят на бременните животни във всяка група да бъде не по-малко от 20. За вещества, които предизвикват нежелани ефекти (например стерилитет, изразена токсичност при най-високата доза), това може да не бъде възможно. Целта е да се предизвикат достатъчно на брой бременности, за да може да се извърши адекватна оценка на потенциала на веществото да въздейства върху фертилитета, бременността, поведението на майките, кърменето, растежа и развитието на животните от поколение F1 от зачеването до достигането на полова зрялост, и развитието на тяхното потомство (F2) до отбиването му. Затова когато не се достигне желаният брой на бременните животни (т.е. 20), не във всички случаи проучването се приема за невалидно. Преценката трябва да се направи за всяко проучване поотделно в зависимост от конкретния случай.

1.4.2. Подготовка на дозите

Препоръчва се изпитваното вещество да се въвежда по орален път (с диетата, водата за пиене или чрез гаваж), освен когато се прецени, че е по-подходящо да се използва друг път на въвеждане (напр. дермален или инхалаторен).

Когато е необходимо, изпитваното вещество се разтваря или суспендира в подходящ носител. Препоръчва се първо да се прецени дали може се използва воден разтвор или суспензия. Когато това не е приложимо, като втора възможност трябва да се обсъди използването на разтвор или емулсия в олио (напр. царевично олио) и след това използването на други носители. Когато се използват други носители освен водата, трябва да се познават токсикологичните свойства на носителя. Трябва да бъде определена стабилността на изпитваното вещество в носителя.

1.4.3. Дози

Трябва да се приложат най-малко три дози. Успоредно с експонираните групи трябва да се наблюдава и нетретирана контролна група. С изключение на случаите, когато се налагат ограничения във връзка с физичните, химичните или биологичните свойства на изпитваното вещество, най-високата доза трябва да бъде подбрана така, че да предизвиква прояви на токсичност, но не и смърт или тежко страдание. Когато въпреки очакванията настъпят смъртни случаи, приблизителната граница, под която смъртността в родителското поколение (P) се приема за допустима, е 10 %. Дозите трябва да се подберат в намаляваща последователност по такъв начин, че да се проявят всички ефекти, свързани с прилагането на изпитваното вещество, и да се установят нива, при които не се наблюдава неблагоприятен ефект (NOAEL). За определяне на последователно намаляващите дози в повечето случаи е най-подходящо всяка доза да намалява два до четири пъти спрямо най-близката по-висока доза. Включването на допълнителна четвърта експонирана група често е за предпочитане пред използването на твърде големи интервали между дозите (напр. намаление повече от 10 пъти). За проучвания, при които веществото се въвежда с диетата, намалението спрямо най-близката доза не трябва да бъде повече от 3 пъти. Дозите трябва да се изберат след преценка на всички съществуващи данни за токсичността, особено на резултатите от изпитвания при многократно постъпване. Всички налични данни за метаболизма и кинетиката на изпитваното химично съединение или подобни химични вещества също трябва да се вземат под внимание. В допълнение тази информация се използва също и при обосновката на схемата за третиране.



Контролната група не се третира или се третира с носителя в случаите, когато при въвеждането на изпитваното вещество се използва носител. С изключение на третирането с изпитваното вещество животните в контролната група трябва да се поставят при същите условия и да се подлагат на същите манипулации, както животните от експонираните групи. Когато се използва носител, той се въвежда на животните от контролната група в най-голямото количество, което се въвежда на експонираните животни. Когато изпитваното вещество се въвежда с диетата и предизвиква намален прием на храна или понижено усвояване на храната, може да се прецени като необходимо използването на контролна група от животни, които да приемат същото количество храна, както експонираните животни. Друг възможен подход вместо включването на такава контролна група е използването на данни от контролирани проучвания на ефекта от понижената консумация на храна върху параметрите на репродукцията.

Трябва да се отчетат следните характеристики на носителя или други добавки, ако се прилагат такива: ефекти върху резорбцията, разпределението, метаболизма или ретенцията на изпитваното вещество в организма; ефекти върху химичните свойства на изпитваното вещество, които могат да повлияят върху токсикологичните му характеристики; ефекти върху консумацията на храна или вода или върху хранителния статус на животните.

1.4.4. **Лимитиращо изпитване**

Може да се прецени, че извършването на изпитването в пълен обем с няколко дози не е необходимо, когато при орално изпитване по описаната в този метод процедура с едно ниво на експозиция (орална дневна доза равна или по-висока от 1 000 mg/kg т.м. или еквивалентно процентно съдържание в диетата или питейната вода) не се наблюдават токсични ефекти при родителските животни или потомството им и когато не се очакват прояви на токсичност въз основа на данните за вещества с подобна химична структура и/или метаболизъм. При лимитиращото изпитване може да се приложи и по-висока орална доза, когато това се налага във връзка с нивото на експозиция за населението. При другите пътища на въвеждане – инхалаторен или дермален, физикохимичните свойства на изпитваното вещество, като например разтворимостта, често могат да повлияят и да ограничат максимално достижимото ниво на експозиция.

1.4.5. **Въвеждане на дозите**

Третирането на животните с изпитваното вещество трябва да се извършва всеки ден (7 дни в седмицата). Желателно е въвеждането да става по орален път (чрез диетата, питейната вода или гаваж). Когато се използва друг път на въвеждане, изборът трябва да се обоснове. В този случай може да се наложи въвеждането на модификации в представения метод. Въвеждането трябва да се извършва по един и същи начин на всички животни през посочения в метода период на изпитването. Когато изпитваното вещество се въвежда чрез гаваж, гаважът трябва да се извърши посредством стомашна сонда. Максималният обем на течностите, който може да се въведе еднократно, е 1 ml/100 g т.м. (0,4 ml/100 g т.м. при носител царевично олио), освен в случаите, когато се прилагат водни разтвори. Тогава обемът може да достигне 2 ml/100 g т.м. Целта е веществото да се въвежда в постоянен обем при всички използвани дози. Промените в обема трябва да бъдат сведени до минимум, като вместо него се променят концентрациите. Това правило не се прилага само при дразнещи и корозивни вещества, тъй ефектът им се засилва при по-високи концентрации. При изпитвания чрез гаваж новородените обикновено са експонирани индиректно чрез майчиното мляко до отбиването им, когато започва директното въвеждане на веществото. При въвеждане чрез храната или питейната вода малките получават изпитваното вещество и директно, когато започнат да се хранят самостоятелно през последната седмица от периода на лактация.



Когато веществото се въвежда чрез храната или питейната вода, то трябва да се прилага в дози, които не влияят върху нормалното хранене и водния баланс. Когато изпитваното вещество се прилага с диетата, нивото на експозиция за дадена група може да се изрази като определена фиксирана концентрация в храната (ppm) или като фиксирана дневна доза спрямо телесната маса на животното. Трябва да се посочи кой от двата начина е приложен. Въвеждането чрез гаваж се извършва всеки ден приблизително по едно и също време, като количеството от веществото, което се въвежда на всяко животно, се определя поне веднъж седмично спрямо телесната му маса, за да се поддържа постоянно нивото на експозиция, съответстващо на избраната доза. При определяне на количеството, което се въвежда чрез гаваж, спрямо телесната маса, трябва да се вземат под внимание и данните за влиянието на плацентата върху разпределението на веществото.

1.4.6. **Експериментални схеми**

Мъжките и женските животни от родителското (P) поколение трябва да започнат да се третираат всеки ден на възраст между 5 и 9 седмици. Ежедневното третиране на мъжките и женските животни от поколение F1 започва при отбиването им. Когато изпитваното вещество се прилага чрез храната или питейната вода, трябва да се има предвид, че животните от поколение F1 може да са били експонирани директно още през периода на лактация. За P и F1 животните от двата пола третирането трябва да продължи най-малко 10 седмици преди периода на чифтосване. Третирането продължава и при двата пола по време на двуседмичния период на чифтосване. Мъжките животни трябва да бъдат убити по хуманен начин и аутопсирани, когато се прецени, че с оглед оценката на репродуктивните ефекти не е необходимо изпитването върху тях да продължава по-дълго. За женските животни от родителското (P) поколение третирането продължава по време на бременността и се прекратява при отбиването на потомството F1. Въз основа на наличната информация за изпитваното вещество, включително съществуващите данни за токсичността, метаболизма или биологичната кумулация, се преценява дали са необходими промени в схемата на третиране. Дозата за всяко животно се определя най-често въз основа на последното измерване на индивидуалната телесна маса. Въпреки това трябва да се подхожда предпазливо, когато се определят дозите през последната третина от бременността.

Третирането на мъжките и женски животни от поколение P и F1 трябва да продължи до убиването им. Всички полово зрели мъжки и женски P и F1 животни трябва да бъдат умъртвени по хуманен начин, когато се прецени, че с оглед оценката на репродуктивните ефекти не е необходимо изпитването върху тях да продължава по-дълго. Животните от поколение F1, които не са избрани за чифтосване, и всички животни от поколение F2 трябва да бъдат умъртвени по хуманен начин след отбиването им.

1.4.7. **Процедура на чифтосването**

1.4.7.1. *Чифтосване на животните от родителското (P) поколение*

Всяко женско животно, определено за чифтосване, се поставя заедно с едно мъжко животно, третирано със същата доза (чифтосване 1:1), докато се осъществи копулация или до изтичането на 2 седмици. Всеки ден женските животни трябва да се преглеждат за наличие на сперма или вагинална запушалка. Денят, в който се установи наличие на сперматозоиди или вагинална запушалка, се определя като ден 0 от бременността. Когато чифтосването е неуспешно, може да се извърши повторно чифтосване на женските животни с мъжки животни с доказан фертилитет от същата опитна група. Животните от всяка двойка, определена за чифтосване, трябва да бъдат ясно идентифицирани в данните от изпитването. Чифтосването между животни от едно и също котило трябва да се избягва.

▼ B**1.4.7.2. Чифтосване на животните от поколение F1**

За чифтосването на F1 животните и получаването на поколение F2 веднага след отбиването се избират най-малко по едно мъжко и едно женско животно от всяко котило, които ще се чифтосат с по едно животно от друго котило, третирано със същата доза. Когато не се откриват значителни различия в телесната маса или вида между животните от дадено котило, животните за чифтосването трябва да се определят на принципа на случайния подбор. Когато се наблюдават такива различия, се подбират представителите от всяко котило, които са в най-добро състояние. На практика се препоръчва този подбор да се извърши въз основа на стойностите на телесната маса, но в някои случаи може да бъде подходящо животните да се изберат според външния им вид. F1 животните не трябва да се чифтосват, преди да достигнат напълно полова зрялост.

Двойките, при които не е настъпило оплождане и бременност, трябва да се изследват, за да се определи възможната причина за безплодието. Оценката на състоянието им може да включва процедури като повторно чифтосване с други мъжки или женски животни с доказан фертилитет, микроскопско изследване на репродуктивните органи и изследване на естралния цикъл или сперматогенезата.

1.4.7.3. Второ чифтосване

В някои случаи, като например при промени в броя на животните в котилото, свързани с експозицията на изпитваното вещество, или при появата на недостатъчно ясно изразени ефекти при първото чифтосване, се препоръчва двойките половозрепи животни от поколение P или F1 да се чифтосат повторно, за да заченат второ котило. Препоръчва се женските или мъжки животни, които не са дали потомство, да се чифтосат повторно с животни от противоположния пол с доказан фертилитет. Когато се прецени, че е необходимо да се получи второ котило от P и/или F1 животните, повторното чифтосване се извършва приблизително една седмица след отбиването на последното котило.

1.4.7.4. Брой на животните в котилото

На животните трябва да се даде възможност да родят нормално и да отгледат потомството си до отбиването. Може да се извърши стандартизиране на броя на животните във всяко котило, но това не е задължителна процедура. Когато се извършва стандартизиране, използваният метод за това трябва да се опише подробно.

1.5. НАБЛЮДЕНИЯ**1.5.1. Клинични наблюдения**

Клиничното наблюдение на животните се извършва всеки ден. Когато въвеждането става чрез гаваж, при наблюдението трябва да се обърне особено внимание на периода след третирането, през който се очаква появата на най-силно изразени ефекти. Трябва да се опишат промените в поведението, признаците на трудно или удължено раждане, както и всички симптоми на токсично действие. Освен това най-малко веднъж седмично трябва да се извърши по-подробен преглед на всяко животно. Подходящо е прегледът да се провежда, когато животните се претеглят. Огледът на всички животни за наличие на патологични клинични симптоми и смъртни случаи се провежда два пъти дневно, а през двата неработни дни в края на седмицата — веднъж дневно, когато се прецени, че това е достатъчно.

▼B**1.5.2. Родителски животни — телесна маса и консумация на храна/вода**

Р животните и F1 животните, определени за чифтосване, трябва да се претеглят на първия ден от началото на третирането, а след това най-малко веднъж седмично. Женските Р животни и женските F1 животни, определени за чифтосване, трябва да се претеглят като минимум в ден 0, 7, 14, и 20 или 21 от гестацията, по време на лактацията в същите дни, когато се претеглят котилата, както и в дните, когато животните се убиват. Тези наблюдения трябва да се описват индивидуално за всяко полово зряло животно. По време на периода преди чифтосването и на бременността количеството на консумираната храна трябва да се измерва най-малко веднъж седмично. Консумацията на вода трябва да се измерва най-малко веднъж седмично, когато изпитваното вещество се въвежда чрез питейната вода.

1.5.3. Естрален цикъл

Продължителността и протичането на естралния цикъл се оценяват при женските животни от поколение Р и F1 чрез изследване на вагинални цитонамазки преди чифтосването и по желание през периода на чифтосването до момента, когато се установят признаците за извършено чифтосване. Материалът за цитонамазката се взема внимателно от вагината/цервикса, за да не се допусне увреждане на лигавицата и последващо индуциране на псевдобременност (1).

1.5.4. Параметри за оценка на състоянието на сперматозоидите

След убиването масата на тестисите и епидидимите на всички мъжки Р и F1 животни се измерва и записва. Единият тестис и епидидим от всяко животно се запазват за хистопатологично изследване (виж точки 1.5.7 и 1.5.8.1). Вторият тестис и епидидим на най-малко 10 мъжки животни от всяка опитна група от поколение Р and F1 се използват за изброяване съответно на сперматидите, резистентни на хомогенизация, и на сперматозоидите в опашката на епидидима. От същите животни се вземат сперматозоиди от опашката на епидидима или *vas deferens* и се изследват подвижността и морфологията им. Когато се наблюдават ефекти, свързани с третирането, или когато са налице данни от други проучвания за възможни ефекти върху сперматогенезата, оценката на състоянието на сперматозоидите трябва да се извърши при всички мъжки животни от всяка експонирана група. Когато липсват такива наблюдения или данни, може да се изследват проби само от мъжките Р и F1 животни от контролната група и най-силно експонираната група.

Трябва да се определи общият брой на тестикуларните сперматиди, резистентни на хомогенизиране, и на сперматозоидите в опашката на епидидима (2)(3). Броят на сперматозоидите в опашката на епидидима може да се изчисли въз основа на концентрацията и обема на сперматозоидите в суспензията, използвана за извършване на качествените наблюдения, както и на броя на сперматозоидите, отделени чрез раздробяване и/или хомогенизиране на останалите тъкани от опашката на епидидима. Изброяването на сперматозоидите в пробите от избраните мъжки животни от всички опитни групи се извършва веднага след убиването им. Това не е необходимо, когато пробите се заснемат на видеозапис или дигитално, или когато се замразяват и анализират по-късно. Когато пробите са съхранени или заснети, анализът им може да започне с контролната група и най-силно експонираната група. Ако не се установяват ефекти, свързани с третирането (например ефекти върху броя, подвижността или морфологията на сперматозоидите), не е необходимо да се анализират пробите от останалите експонирани групи. Когато при най-силно експонираната група се откриват ефекти, свързани с третирането, се анализират и пробите от групите с по-ниски дози.

▼ B

Веднага след убиването на животните подвижността на сперматозоидите от епидидима (или *ductus deferens*) трябва да се оцени или да се направи видеозапис на пробата. Сперматозоидите трябва да се отделят с минимални увреждания и пробата да се разрези за анализ на подвижността, който се извършва чрез подходящи методи (4). Относителният дял (в проценти) на прогресивно подвижните сперматозоиди трябва да се определи субективно или обективно. Когато се извършва компютърен анализ на движението на сперматозоидите (5)(6)(7)(8)(9)(10), изчислението на прогресивната подвижност зависи от определените от потребителя прагове за скорост по средния път и праволинейност на движението или линеен индекс. По време на аутопсията пробите могат да бъдат заснети на видеозапис (11) или по друг начин. По-късно те се анализират, като първоначално се изследват само контролните групи и групите с най-високата доза от P и F1 поколение. При наличие на ефекти, свързани с третирането, се изследват и групите, експонирани на по-ниски дози. Когато не са заснети на видеозапис или дигитално, всички проби от всички опитни групи се анализират по време на аутопсията.

Извършва се морфологично изследване на сперматозоиди от епидидима (или *vas deferens*). Сперматозоидите (най-малко 200 в една проба) се изследват във фиксирани влажни препарати (12) и се класифицират като нормални или абнормни. Примери за морфологични отклонения са: слепване, наличие на глави, отделени от тялото и опашката, промени във формата на главите и/или опашките. Оценката на пробите от избраните мъжки животни от всички експонирани групи трябва да се извърши веднага след убиване на животните, или по-късно, чрез използването на видео- или дигитални записи. Намазките също могат да се анализират по-късно, след като се фиксират. В тези случаи първо може да се извърши оценка на пробите от контролната група и най-силно експонираната група. Когато не се откриват ефекти, свързани с третирането (например ефекти върху морфологията на сперматозоидите), не е необходимо да се изследват останалите групи. Когато при най-високата доза се откриват ефекти, свързани с третирането, пробите от групите, третирани с по-ниски дози, също се анализират.

Когато някои от посочените по-горе параметри за оценка на състоянието на сперматозоидите вече са били изследвани по време на проучване на системната токсичност с продължителност най-малко 90 дни, не е задължително те да се изследват повторно в проучването в две поколения. Препоръчва се, обаче, пробите от сперматозоидите на P мъжките животни или дигиталните им образи да бъдат съхранени, за да може по-нататък да се извърши оценка, ако това е необходимо.

1.5.5. Потомство

Всяко котило трябва да бъде прегледано възможно най-скоро след раждането (ден 0 от периода на лактация), за да се установи броят и полът на новородените, броят на мъртвородените и на живите, както и наличието на външни аномалии. Когато в ден 0 сред новородените има мъртви животни и трупове им не са мацерирани, желателно е те да се прегледат за установяване причината за смъртта и за наличие на дефекти и да се запазят. Живите новородени трябва да се преброят и всяко от тях да се претегли в деня на раждането (ден 0 от периода на лактация) или в ден 1. По-нататък телесната им маса трябва да се измерва редовно в определени дни, например в ден 4, 7, 14, и 21 от периода на лактация. Физическите аномалии или отклоненията в поведението, установени при майките или в потомството, трябва да се опишат.

▼ B

Основният показател за физическото развитие на потомството, който се проследява и регистрира, е прирастът на телесната маса. Други параметри на физическото развитие (например отлепване на ушната мида, отваряне на очите, пробиване на зъбите, израстване на козина) могат да дадат допълнителна информация, но е желателно тези данни да се оценяват в контекста на данните за половото съзряване (например възраст и телесна маса при отварянето на вагината или отделянето на препуциума) (13). Препоръчва се извършването на функционални изследвания (например за моторна активност, сензорна функция, рефлексна дейност) върху поколение F1 преди и/или след отбиването, по-специално на изследвания, свързани с половото съзряване, когато такива изследвания не са включени в отделни проучвания. Възрастта, при която настъпва отварянето на вагината или отделянето на препуциума, трябва да се определи за F1 животните, избрани за чифтосване. Когато са установени данни за промяна в съотношението между двата пола или във времето за настъпване на полова зрялост при животните от поколение F1, на постнатален ден 0 трябва да се измери разстоянието между ануса и половите органи при новородените от поколение F2.

Функционалните изследвания могат да не се извършват в групите, при които се откриват ясно изразени признаци на неблагоприятни ефекти (например значително понижение в телесната маса и т.н.). Когато се провеждат функционални изследвания, те не трябва да се извършват върху малките, избрани за чифтосване.

1.5.6. **Макроскопски оглед при аутопсиране**

При убиването или смъртта по време на изпитването се извършва макроскопски оглед за наличие на структурни аномалии или патологични промени, като се обхващат всички родителски животни (P и F1), всички малки с външни аномалии или клинични симптоми, както и по едно случайно избрано малко от всеки пол и всяко котило на поколение F1 и F2. Особено внимание при огледа трябва да се обърне на органите на половата система. Малките от поколение F1 и F2, които са били в терминално състояние и са убити по хуманен начин, или са умрели, но трупове им не са мацерирани, трябва да се изследват за възможни дефекти и/или причини за смъртта. Трупове им трябва да се запазят.

Матките на всички женски животни, родили за първи път, трябва да се изследват за наличие и брой на места на имплантация. Изследването трябва да се проведе така, че да не се попречи на извършването на хистопатологично изследване.

1.5.7. **Органна маса**

При всички родителски P и F1 животни в момента на убиването трябва да се измери телесната маса и масата на следните органи (всеки от чифтните органи трябва да се претегли отделно):

- матка, яйчници;
- тестиси, епидидими (целият епидидим и отделно опашката на епидидима);
- простатна жлеза;
- семенни мехурчета с коагулиращите жлези, течното им съдържимо и простатата жлеза (измерват се заедно);
- мозък, черен дроб, бъбреци, слезка, хипофизна, щитовидна и надбъбречни жлези, познати критични органи.

Телесната маса при настъпване на смъртта трябва да бъде измерена за малките от поколение F1 и F2, които са избрани за аутопсиране. Трябва да бъдат претеглени следните органи от едно случайно избрано малко от всеки пол и от всяко котило (виж точка 1.5.6): мозък, слезка и тимус.

▼ B

Резултатите от макроскопския оглед и измерването на органната маса трябва да се оценяват в контекста на наблюденията, проведени по време на други изпитвания при многократно постъпване на веществото, когато това е възможно.

1.5.8. **Хистопатологично изследване**1.5.8.1. *Родителски животни*

Следните органи и тъкани от родителските Р и F1 животни или репрезентативни проби от тях трябва да се фиксират и съхранят в подходяща среда за провеждане на хистопатологично изследване:

- вагина, матка (заедно с цервикса) и яйчници (съхранени в подходящ фиксатор);
- един тестис (съхранен във фиксатор на Bouin или друг подобен фиксатор), един епидидим, семенни мехурчета, простатна и коагулираща жлеза;
- критичен орган/органи, установени при предишни проучвания, от всички Р и F1 животни, избрани за чифтосване.

Пълно хистопатологично изследване на съхранените органи и тъкани, изброени по-горе, трябва да бъде направено за всички Р и F1 животни от контролната и най-силно експонираната група, избрани за чифтосване. По желание може да се извърши изследване на яйчниците на животните от Р поколение. Органите, при които се установяват промени, свързани с третирането, трябва да бъдат изследвани също така и при животните от групите с най-ниската и междинната доза/доза, за да може да се установи NOAEL. Освен това на хистопатологично изследване трябва да бъдат подложени репродуктивните органи на животните от групите с най-ниската доза и междинната доза/доза, при които има съмнение за понижен фертилитет, например тези, при които чифтосването, оплождането или зачеването са били неуспешни, тези, които не са родили здраво потомство, както и тези, при които е нарушен естралният цикъл или се установяват промени в броя, подвижността или морфологията на сперматозоидите. Всички макроскопски лезии, като например атрофия или тумори, трябва да се изследват и хистопатологично.

Трябва да се извърши подробно хистопатологично изследване на тестисите (напр. чрез използване на фиксатора на Bouin, заливане с течен парафин и изготвяне на напречни срезове с дебелина 4—5 µm), за да се открият ефекти, свързани с третирането, например наличие на мултинуклеарни гигантски клетки, задържани сперматиди, излющване на сперматогенни клетки в лумена на извитите семенни каналчета или липсващи слоеве или видове герминативни клетки (14). Пълното изследване на епидидима трябва да обхваща главата, тялото и опашката, което може да се извърши, като се използва надлъжен срез. Епидидимът трябва да се изследва за наличие на левкоцитна инфилтрация, промени в броя на отделните видове клетки, аберантни видове клетки и фагоцитоза на сперматозоидите. При изследването на мъжките полови органи може да се използва оцветяване с хематоксилин и ПАС-реакция.

След прекратяване на лактацията яйчникът трябва да съдържа примордиални и зреещи фоликули, както и големи жълти тела. Чрез хистопатологичното изследване може качествено да се установи намаляване в броя на примордиалните фоликули. Количествената оценка на популацията от примордиални фоликули се извършва при женските животни от поколение F1. Броят на животните, изборът на срезове и броят на срезовете, включени в изследваната извадка, трябва да бъдат обосновани от статистическа гледна точка във връзка с използваната процедура за количествена оценка. Изследването включва определяне на броя на примордиалните фоликули, които могат да се изброят заедно с малките зреещи фоликули. След това броят на фоликулите се сравнява между контролните и експонираните животни (15) (16) (17) (18) (19).

▼B1.5.8.2. *Животни след отбиването*

Тъкани с видими аномалии и критични органи от всички малки с външни аномалии или клинични симптоми, както и от едно случайно подбрано малко от всяко котило и пол в поколение F1 и F2, което не е било избрано за чифтосване, трябва да бъдат фиксирани и съхранени в подходяща среда за хистопатологично изследване. Трябва да се извърши пълно хистопатологично изследване на съхранените тъкани, като специално внимание се обърне на органите на половата система.

2. **ДАНИИ**

2.1. ПРЕДСТАВЯНЕ И ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Данните трябва да се представят, както индивидуално за всяко животно, така и обобщено в табличен вид, като за всяка опитна група и поколение се посочи броят на животните в началото на изпитването, броят на животните, умрели по време на изпитването или умъртвени по хуманни съображения, времето на настъпване на смъртта или умъртвяването по хуманни съображения, броят на фертилните животни, броят на бременните женски животни, броят на животните със симптоми на токсично действие, характеристиката на наблюдаваните симптоми, включително време на поява, продължителност и степен на изразеност, наблюденията при родителските животни и при потомството, хистопатологичните промени, както и всички необходими данни за котилата.

Резултатите, изразени количествено, трябва да се оценят чрез подходящи общоприети статистически методи. Статистическите методи трябва да се определят във връзка с дизайна на проучването и да се обосноват. При анализа на данните могат да се използват статистически модели на връзката „доза—отговор“. Отчетът трябва да включва достатъчно информация за използваните методи и компютърните програми, с които е извършен анализът, така че той да може да се възпроизведе и оцени от независим рецензент/статистик.

2.2. ОЦЕНКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Оценката на резултатите от изпитването за репродуктивна токсичност в две поколения се извършва въз основа на наблюдаваните ефекти, включително данните от макроскопския оглед и хистопатологичното изследване. Оценката включва характеристика на връзката или установяване на отсъствие на връзка между дозата на изпитваното вещество и наличието или отсъствието, честотата и степента на изразеност на наблюдаваните промени, включително макроскопски лезии, ефекти върху критични органи, нарушения във фертилитета, клинични симптоми, нарушения в протичането на бременността, раждането и състоянието на потомството, промени в телесната маса, ефекти върху смъртността и всички други токсични ефекти. Физикохимичните свойства на изпитваното вещество и токсикокинетичните данни, когато такива са налице, трябва да се вземат под внимание при оценката на резултатите от изпитването.

При правилно провеждане на изпитването за репродуктивна токсичност трябва достатъчно обосновано да се определи недействащо ниво и да се характеризират неблагоприятните ефекти върху възпроизводството, раждането, лактацията, постнаталното развитие, включително растежа и половото развитие.



2.3. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Чрез изпитването за оценка на репродуктивната токсичност в две поколения се осигурява информация за ефектите на изпитваното вещество при многократно постъпване през всички фази на репродуктивния цикъл. По-специално изпитването дава информация за параметрите на възпроизводителната функция, както и на развитието, растежа, съзряването и преживяемостта на потомството. Резултатите от изпитването трябва да бъдат интерпретирани във връзка с наблюденията от проучванията на субхроничната токсичност, пренаталната токсичност за развитието, токсикокинетиката и други достъпни проучвания. Резултатите от това изпитване трябва да бъдат използвани при оценката на необходимостта от по-нататъшно изследване на химичното вещество. Екстраполацията на резултатите от това изпитване за хора е валидна в ограничена степен. Най-голямо приложение намират резултатите, получени за недействащите нива, които се използват при определяне на допустимите нива на експозиция за хора (20) (21) (22) (23).

3. ДОКЛАДВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

3.1. ОТЧЕТ ЗА ИЗПИТВАНЕТО

Отчетът за изпитването трябва да включва следната информация:

Изпитвано вещество:

- физична природа и, където е необходимо, физикохимични свойства;
- данни за идентифициране на химичното вещество;
- степен на чистота на веществото.

Носител (когато се използва такъв):

- обосновка за избора на носителя, когато той е различен от водата.

Опитни животни:

- използван вид/порода;
- брой, възраст и пол на животните;
- източник за доставка на животните, условия на отглеждане във вивариума, диета, материали за приготвяне на гнездо и др.;
- индивидуална телесна маса на животните в началото на изпитването.

Условия на провеждане на изпитването:

- обосновка за избора на дозите;
- описание на подготовката на изпитваното вещество за въвеждане (приготвяне на формулация/включване в храната), използвани концентрации;
- стабилност и хомогенност на формулацията;
- описание на въвеждането на изпитваното вещество;
- изчисляване на достигнатите дневни дози (mg/kg т.м.) въз основа на концентрациите на изпитваното вещество в диетата/питейната вода (ppm), когато това е приложимо;

▼ B

- критерии за качество, на които отговарят храната и водата за пиене.

Резултати:

- данни за консумацията на храна; данни за консумацията на вода, когато такива са налице; усвояване на храната (прираст на телесната маса на грам консумирана храна); прием на изпитваното вещество от P и F1 животни с изключение на времето, през което женските и мъжките животни са съжителствали заедно, както и на периода на лактация (като минимум последната третина от този период);
- данни за резорбцията на веществото (когато такива са налице);
- данни за телесната маса на P и F1 животните, избрани за чифтосване;
- данни за телесната маса на малките (индивидуално и за всяко котило);
- телесна маса в деня на убиването и абсолютна и относителна органна маса за родителските животни;
- природа, степен на изразеност, продължителност и обратимост на клиничните симптоми;
- време на настъпване на смъртта по време на проучването, като се отбелязва кои животни са преживели до деня на убиването;
- данни за токсичния отговор в групите по пол и ниво на експозиция, включително индекси на чифтосване, фертилитет, гестация, раждане, преживяемост и лактация; в отчета трябва да се посочат конкретните стойности, въз основа на които са изчислени тези индекси;
- токсични или други ефекти върху възпроизводството, потомството, постнаталния растеж и т.н.;
- наблюдения при макроскопския оглед;
- подробно описание на всички хистопатологични промени;
- брой на женските животни от поколение P и F1 с нормален естрален цикъл; продължителност на цикъла;
- общ брой на сперматозоидите в опашката на епидидима, процент на прогресивно подвижните сперматозоиди, процент на сперматозоидите с нормална морфология; процент на сперматозоидите с всеки вид аномалия, който е установен;
- време до чифтосването (брой на дните до извършване на чифтосването);
- продължителност на бременността;
- брой на имплантациите и жълтите тела; брой на животните във всяко котило;
- брой на живородените и постимплантационните загуби;
- брой на малките, родени с видими външни аномалии; когато е определен броят на животните с ниска телесна маса при раждането, той трябва да се посочи;
- данни за характерните физически особености на потомството и други данни за постнаталното развитие; трябва да се обоснове подборът на разгледаните характерни физически особености;
- данни за функционалните наблюдения при малките и при полово зрелите животни, когато това е приложимо;
- статистическа обработка на резултатите, когато това е необходимо.

▼B

Обсъждане на резултатите.

Заключения, включително стойности на NOAEL, за ефектите върху майките и потомството.

4.

ПРЕПРАТКИ

- (1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.
- (2) Gray, L.E. et al., (1989). A DoseResponse Analysis of MethoxychlorInduced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92—108.
- (3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103—107.
- (4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39 44
- (5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237—244.
- (6) Chapin, R.E. et al., (1992).Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267—273.
- (7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409—421.
- (8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449—458.
- (9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). ComputerAssisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the HamiltonThorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology*, Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319—333.
- (10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. *Journal of Andrology* 10: 401—415.
- (11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. *Journal of Andrology* 8:330—337.
- (12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. *Reproductive Toxicology* 6:491—505.
- (13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. *Biological Reproduction* 17:298—303.
- (14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.
- (15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, *Methods in Toxicology*, Academic, Orlando, Florida.
- (16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: *Growth Factors and the Ovary*, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421—426.
- (17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

- (18) Smith, B.J. et al. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. *Reproductive Toxicology* 5:379—383.
- (19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: *An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment*, G. Daston, and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.
- (20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: *Casarett and Doull's Toxicology*, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.
- (21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.
- (22) Palmer, A.K. (1981). In: *Developmental Toxicology*, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.
- (23) Palmer, A.K. (1978). In *Handbook of Teratology*, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼ M4

Б.36. ТОКСИКОКИНЕТИКА

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоеен на Указание за изпитване 417 на ОИСП (ОИСП 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 относителността 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 относителността, 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.

▼ **M4**

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 аналози 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 CO₂ и др.). За характеризирането на някои от тези параметри може да не се изисква използване на белязани химикали.

▼ **M4****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 бъде 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—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}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,

▼ **M4**

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 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 разгледана 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 LD_{50} (по орален и дермален път) или 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.

▼ M4

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 токсикокинетичното 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 разгледани 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 разгледани 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 канюлира югуларната вена (за прилагане на изпитвания химикал и/или за вземане на кръв) или ако за

▼ **M4**

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 токсикокинетиката. 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 приложени 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 канюлирани, 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:

(количество едновременно в жлъчка, урина, издишан

Процент абсорбция = $\frac{\text{въздух и труп без да се отчита съдържанието в}$
 $\text{стомашно – чревния тракт})/\text{приложено количество} \times 100$

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 канюлиран 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 канюлиран или плъх с канюлиран жлъчен канал) (вж. точки 35). Когато количествено определяне на чревната секреция се счита за необходимо, препоръчва се също така измерване на екскрецията при плъх с канюлиран жлъчен канал след доза, приложена по интравенозен път.

▼ **M4***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 белязан 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. Познването 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_{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_{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).

▼ **M4**

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 течност-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 отделяне 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 спектроскопия.
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.

▼ **M4***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 графици 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 графици за събирането.
49. Събирането на издишания CO_2 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 разгледано, ако има доказателство в подкрепа на значителни разлики по отношение на токсичността, свързани с пола.

▼ **M4**

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. характеризиране 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 свързането 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;

▼ **M4**

- 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 P450-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 разгледани 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 характеризиране 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 разгледани с оглед използване при определянето на потенциалните междувидови различия в биотрансформацията. Резултатите от проучванията *in vitro* също могат да допринесат за развитието на РВТК модели (5).

▼ **M4**

60. Изследванията *in vitro* на дермалната абсорбция могат да предоставят допълнителна информация за характеризиране 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. СYP1A1, 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 на разработването на некомпартментни или физиологично характеризирани модели (7).

▼ M4**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 представена 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;

▼ M4

- 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 използваните 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.

▼ M4

- 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, полуживот) 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.

▼ **M4**

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 доставяне 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 това би 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. Участъците, 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 третираната 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 дискусията 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 третираната 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.

▼ **M4****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.

▼ **M4***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-сцинтиляционно 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

▼ **M4**

(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 представяващ интерес изпитван химикал в друг химикал в тялото. Синоним е на „метаболизъм“.

C_{max}: Или максимална (върхова) концентрация в кръвта (плазма/серум) след прилагането, или максимална (върхова) екскреция (в урина или изпращания) 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)].

▼ M4

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-обща 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 ксенобиотик 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 характеризирани токсикокинетично, фармакокинетично характеризирани, физиологично характеризирани фармакокинетично, биологично характеризирани 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.

▼ M4

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-сцинтилационно броене, или чрез качествена и/или количествена авторадиография 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_{max}: Време за достигане на C_{max}.

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.

▼B

**Б.37. ЗАБАВЕНА НЕВРОТОКСИЧНОСТ КЪМ ОРГАНИЧНИ
ФОСФОР-СЪДЪРЖАЩИ ВЕЩЕСТВА СЛЕД ОСТРО
ИЗЛАГАНЕ**

1. МЕТОД

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

При оценка на токсичните ефекти на веществата е необходимо да се има предвид способността на определени класове вещества да предизвикват специфичен вид невротоксичност, неоткрита в други проучвания. Установено е, че определени органични фосфор-съдържащи вещества предизвикват забавен тип невротоксичност и следва да се считат за потенциални кандидати за оценка.

Могат да се използват скриниращи тестове *in vitro* с цел идентифициране на веществата, които предизвикват късна полиневропатия; отрицателните находки обаче от изследванията *in vitro* не изключват възможността проучваното вещество да притежава невротоксичен потенциал.

Вж. Общо въведение, част Б.

1.2. ДЕФИНИЦИИ

Органичните фосфор-съдържащи вещества включват ненатоварени фосфор-органични естери, тиоестери или анхидриди на органичните фосфорни, органичните фосфони или органичните фосфорамидни киселини или свързаните с тях фосфоротични, фосфонотични или фосфортиоамидни киселини, или други вещества, които могат да предизвикат забавена невротоксичност, понякога наблюдавана в този клас вещества.

Забавената невротоксичност е синдром, свързан с късно проявена атаксия, дистална аксонопатия на гръбначния мозък и периферните нерви, както и инхибиране и остаряване на таргетната за невропатия естераза (NTE — neuropathy target esterase), намираща се в нервната тъкан.

1.3. РЕФЕРЕНТНИ ВЕЩЕСТВА

Референтно вещество може да бъде тествано с положителна контролна група с цел потвърждаване, че при лабораторни условия реакцията на опитните породи не се променя значително.

Пример за широко използвано невротоксично вещество е три-о-толил фосфат (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS номенклатура: фосфориста киселина, три(2-метилфенилов)естер), познато и под името три-о-крезилфосфат.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

Проучваното вещество се прилага орално, в единична доза, на домашни кокошки, при необходимост протектирани от остри холинергични ефекти. Животните се наблюдават в продължение на 21 дни за поведенчески отклонения, атаксия и парализи. Биохимичните измервания, в частност инхибиране на таргетната за невропатия естераза (NTE), се извършват върху случайно подбрани от всяка група кокошки, обикновено 24 и 48 часа след дозирането. Двадесет и един дни след излагането останалите кокошки се убиват, след което се извършват хистопатологични изследвания на определени нервни тъкани.

▼ B

1.5. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

1.5.1. Подготовка

Здрави, млади, пораснали кокошки, неболедуващи от вирусни заболявания, неполучаващи лекарства и без нарушения в походката, се подбират по случаен признак и се разпределят в третираните или контролните групи, като в продължение на поне 5 дни преди началото на проучването се аклиматизират към лабораторните условия.

Използват се достатъчно големи клетки или ограждения, позволяващи свободното движение на кокошките и незатрудняващи наблюдението върху походката им.

Дозирането с проучваното вещество обикновено се извършва орално, като се използва сонда, желатинови капсули или друг сравним метод. Течностите се дават неразредени или разредени в съответна среда, като например царевично олио; при възможност твърдите вещества се разтварят, тъй като големи дози твърди вещества в желатинови капсули не се абсорбират достатъчно ефективно. За нетечните среди следва предварително да се знаят токсичните свойства на средата, а ако не се познават — да се определят преди началото на теста.

1.5.2. Условия за провеждане на теста

1.5.2.1. *Опитни животни*

Препоръчва се използването на млади пораснали носещи кокошки (*Gallus gallus domesticus*), на възраст 8—12 месеца. Участват стандартни видове и породи, кокошките се отглеждат при условия, позволяващи свободно движение.

1.5.2.2. *Брой и пол*

В допълнение към третираната група следва да се използват и други две групи — контролна за действието на средата и положителна контролна. Контролната група за средата се третира по същия начин както и третираната група, с изключение на това, че проучваното вещество не се прилага.

Следва да участват достатъчно голям брой кокошки във всяка група, така че поне шест птици да бъдат убити с цел биохимични проучвания (по три във всяка от двете времеви точки) и шест да преживеят 21-дневния период на наблюдение с цел хистопатологично изследване.

Положителната контролна група може да участва едновременно в проучването или да се използват най-новите литературни данни за контролна група. В нея следва да участват поне шест кокошки, третирани с познато невротоксично вещество със забавено начало, от които три за биохимични и три за патологични изследвания. Препоръчва се периодичното обновяване на данните. Необходимо е събиране на нови данни за положителна контролна група, в случай че изследващата лаборатория промени някой основен елемент на провежданото проучване (напр. порода, хранене, условия на отглеждане).

▼B1.5.2.3. *Нива на доза*

Провежда се предварително проучване, използващо съответен брой кокошки и групи с различни нива на доза, с цел определяне на нивото, което ще бъде използвано в основното проучване. За да се определи възможно най-подходящата доза за основното проучване, е необходимо е да има известен леталитет в това предварително проучване. За да се предотврати смърт, дължаща се на остри холинергични ефекти, може да се използва атропин или друго протективно вещество, за което се знае, че не си взаимодейства с реакциите на забавена невротоксичност. Могат да се използват различни тест-методи за определяне на максималната нелетална доза за проучваното вещество (вж. метод Б.1а). При избора на доза могат да се окажат полезни както литературните данни за кокошките, така и всяка друга токсикологична информация.

Нивото на доза на проучваното вещество в основното изследване следва да бъде възможно най-високото, имайки предвид резултатите от предварителното проучване за избор на доза, както и горната граница на дозата — 2 000 mg/kg телесно тегло. Всеки един смъртен случай, който може да настъпи, не бива да пречи на преживяването на достатъчен брой животни, необходими за биохимичните (шест) и хистологичните (шест) изследвания на 21-вия ден. За да се предотврати смърт, дължаща се на остри холинергични ефекти, може да се използва атропин или друго протективно вещество, за което се знае, че не си взаимодейства с реакциите на забавена невротоксичност.

1.5.2.4. *Тест за определяне на граница*

Ако тест при ниво на доза от поне 2 000 mg/kg телесно тегло/ден, използвайки процедурите, описани в това проучване, не предизвиква видими токсични ефекти и ако не се очаква токсичност, изхождайки от данните за структурно свързани вещества, то тогава не е необходимо да се извършва проучване, използващо по-висока доза. Прилага се тестът за определяне на граници, освен ако излагането на хора показва необходимост от използване на по-високо ниво на доза.

1.5.2.5. *Период на наблюдение*

Периодът на наблюдение следва да продължи 21 дни.

1.5.3. **Процедура**

След прилагане на протективно вещество, което да предотврати смърт, дължаща се на остър холинергичен ефект, се прилага и проучваното вещество в единична доза.

1.5.3.1. *Общо наблюдение*

Наблюденията започват веднага след излагането. Всички кокошки се наблюдават внимателно няколко пъти на ден през първите 2 дни, след което — поне един път дневно за период от 21 дни или до момента на убиване. Записват се всички симптоми на токсичност, включително начално време, вид, тежест и продължителност на поведенческите отклонения. Атаксията се измерва според обикновена скала за степени, състояща се от поне четири нива, парализите следва да се отбелязват. Поне два пъти седмично кокошките, определени за хистопатологично изследване, се извеждат извън клетките и се подлагат за период от време на форсирана двигателна активност, например изкачване на стълба, с цел улесняване откриването на минимални токсични ефекти. Морибундните животни и тези, изпитващи тежък дистрес или болка, се отстраняват, хуманно се убиват и дисецират.

▼B

1.5.3.2. *Телесно тегло*

Всички животни се претеглят точно преди прилагане на проучваното вещество, след което — поне един път седмично.

1.5.3.3. *Биохимия*

Шест случайно подбрани кокошки от всяка една третирана група и контролната на средата група, както и три кокошки от положителната контролна група (в случай че и тя участва едновременно), следва да бъдат убити в рамките на няколко дни след дозирането, приготвят се хистологични препарати от главния мозък и поясната част на гръбначния мозък, които се изследват за инхибираща активност на таргетната за невротоксичност естераза. В допълнение би било полезно да се запази и изследва тъкан от нервус ишиадикус за инхибираща активност на таргетната за невропатия естераза. Обикновено след 24 и 48 часа се убиват по три птици от контролната и всяка една от третираните групи, докато трите кокошки от групата на положителните контроли следва да се убият на 24-ия час. Ако наблюдението на клиничните симптоми на интоксикация (това често се преценява чрез наблюдение на времето на поява на холинергични белези) показва, че токсичното вещество може да бъде отстранено много бавно, тогава се предпочитат вземане на проби от три птици във всяко от двете времена между 24 и най-късно 72 часа след дозирането.

Върху тези препарати може да се изследва и активността на ацетилхолинестеразата (AChE), ако се прецени, че е уместно. Спонтанна реактивация на AChE може да настъпи *in vivo* и така да доведе до подценяване на способността на веществото като AChE инхибитор.

1.5.3.4. *Макроскопска дисекция*

Извършва се макроскопска дисекция на всички животни (определени за убиване и убити в морибундно състояние), която включва описание на изгледа на главния и гръбначния мозък.

1.5.3.5. *Хистопатологично изследване*

Нервната тъкан на животните, преживели периода на наблюдение и неизползвани за биохимични проучвания, се подлага на микроскопско изследване. Тъканите се фиксират *in situ*, като се използват перфузионни техники. Препаратите следва да включват малкия мозък (срединен надлъжен срез), продълговатия мозък, гръбначния мозък и периферни нерви. Материал от гръбначния мозък се взема на ниво горен шиен отдел, средногръден и лумбо-сакрален. Взема се и материал от дисталния отдел на тибиялния нерв и неговите клонове към мускулус гастрокнемиус и нервус ишиадикус. Препаратите се оцветяват съответно и специфично за миелин и аксон.

2. **ДАННИ**

Отрицателните резултати за крайните цели, избрани за този метод (биохимия, хистопатология и наблюдение на поведението), обикновено не изискват по-нататъшно тестване за забавена невротоксичност. Еднозначните или неинформативните резултати по отношение на тези крайни цели може да наложат по-нататъшно уточняване.

Предоставят се индивидуалните данни. В допълнение, всички данни са обобщават в таблична форма, показваща за всяка опитна група: броя на животни в началото на теста, броя на животните, показали увреждания, поведенчески или биохимични отклонения, вид и тежест на тези увреждания или ефекти, както и процент на животните, показали определен тип и тежест на уврежданията или ефекта.

▼B

Находките от това проучване се оценяват от гледна точка на честота, тежест и взаимна връзка между поведенческите, биохимичните и хистопатологичните ефекти, както и всеки друг наблюдаван ефект в третираните и контролните групи.

Числовите резултати следва да бъдат оценени чрез съответни и общоприети статистически методи. Статистическите методи се подбират по време на проектиране на проучването.

3. ДОКЛАДВАНЕ**ДОКЛАД ЗА ТЕСТА**

Докладът за теста следва да съдържа по възможност следната информация:

Опитни животни:

- използвани породи;
- брой и възраст на животните;
- източник, условия на отглеждане, хранене и т.н.;
- индивидуално тегло на животните в началото на теста.

Условия на теста:

- подробности относно приготвяне на проучваното вещество, стабилност и хомогенност, където е възможно;
- обосновка за избор на средата;
- подробности относно прилагане на проучваното вещество;
- подробности относно качество на храната и водата;
- обосновка на избора на доза;
- спецификация на приложените дози, включително подробности за средата, обема и физичната форма на прилаганото вещество;
- същност и подробности за прилагането на каквито и да са протективни вещества.

Резултати:

- данни за телесното тегло;
- данни за отговора към токсичност според групата, включително и смъртност;
- същност, тежест и продължителност на клиничните наблюдения (обратимост на наблюдаваното или не);
- подробно описание на биохимичните методи и находки;
- находки при дисекцията;
- подробно описание на всички хистопатологични данни;
- статистическа обработка на резултатите, където е уместно.

Обсъждане на резултатите.

Изводи.

4. ПРЕПРАТКИ

Този метод е еднакъв с OECD TG 418.

▼B

**Б.38. ЗАБАВЕНА НЕВРОТОКСИЧНОСТ КЪМ ОРГАНИЧНИ
ФОСФОР-СЪДЪРЖАЩИ ВЕЩЕСТВА НА 28-ИЯ ДЕН В
ПРОУЧВАНЕ ЗА ПОВТАРЯЩА СЕ ДОЗА**

1. МЕТОД

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

При оценка на токсичните ефекти на веществата е необходимо да се има предвид способността на определени класове вещества да предизвикват специфичен вид невротоксичност, неоткрита в други проучвания. Установено е, че определени органични фосфор-съдържащи вещества предизвикват забавен тип невротоксичност и следва да се смятат за потенциални кандидати за оценка.

Могат да използват скриниращи тестове *in vitro* с цел идентифициране на веществата, които могат да предизвикат късна полиневропатия; отрицателните находки, обаче, от изследванията *in vitro* не изключват възможността проучваното вещество да притежава невротоксичен потенциал.

Настоящият 28-дневен тест за забавена невротоксичност дава информация за възможните здравни рискове, които могат да се появят в резултат на повтарящи се излагания в ограничен период от време. Той дава информация за отговор на доза и предлага оценка на ненаблюдаваните странични ефекти, която е полезна за установяване на критерии за безопасно излагане.

Вж. също Общо въведение, част Б.

1.2. ДЕФИНИЦИИ

Органичните фосфор-съдържащи вещества включват ненатоварени фосфор-органични естери, тиоестери или анхидриди на органичните фосфорни, органичните фосфони или органичните фосфорамидни киселини или свързаните с тях фосфоротични, фосфонотични или фосфортюамидни киселини, или други вещества, които могат да предизвикат забавена невротоксичност, понякога наблюдавана в този клас вещества.

Забавената невротоксичност е синдром, свързан с късно проявена атаксия, дистална аксонопатия на гръбначния мозък и периферните нерви, както и инхибиране и остаряване на таргетната за невропатия естераза (NTE — neuropathy target esterase), намираща се в нервната тъкан.

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

Проучваното вещество се прилага ежедневно орално на домашни кокошки в продължение на 28 дни. Животните се наблюдават поне един път дневно за поведенчески отклонения, атаксия и парализи до 14-ия ден след последната доза. Биохимичните измервания, в частност инхибиране на таргетната за невропатия естераза (NTE), се извършват върху случайно подбрани от всяка група кокошки, обикновено 24 и 48 часа след дозирането. Две седмици след последната доза се убиват и останалите кокошки, след което се извършват хистопатологични изследвания на определени нервни тъкани.

▼B

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

1.4.1. Подготовка

Здрави млади, пораснали кокошки, неболедуващи от вирусни заболявания, неполучаващи лекарства и без нарушения в походката се подбират по случаен признак и се разпределят в третираните или контролна групи, като в продължение на поне 5 дни преди началото на проучването се аклиматизират към лабораторните условия.

Използват се достатъчно големи клетки или ограждения, позволяващи свободното движение на кокошките и незатрудняващи наблюдението върху походката им.

Дозирането се извършва всеки ден, 7 дни седмично, за предпочитане чрез сонда или желатинови капсули. Течностите се дават неразредени или разредени в съответна среда, като например царевично олио; при възможност твърдите вещества се разтварят, тъй като големи дози твърди вещества в желатинови капсули не се абсорбират достатъчно ефективно. За нетечните среди следва предварително да се знаят токсичните свойства на средата, а ако не се познават — да се определят преди началото на теста.

1.4.2. Условия за провеждане на теста

1.4.2.1. *Опитни животни*

Препоръчва се използването на млади пораснали носещи кокошки (*Gallus gallus domesticus*) на възраст 8—12 месеца. Участват стандартни видове и породи, кокошките се отглеждат при условия, позволяващи свободно движение.

1.4.2.2. *Брой и пол*

Обикновено се използват поне три третиранни групи и една контролна за действието на средата. Контролната група за средата се третира по същия начин, както и третираната група, с изключение на това, че проучваното вещество не се прилага.

Следва да участват достатъчно голям брой кокошки във всяка група, така че поне шест птици да бъдат убити с цел биохимични проучвания (по три във всяка от двете времеви точки) и шест да преживеят 14-дневния период на наблюдение с цел хистопатологично изследване.

1.4.2.3. *Нива на доза*

Нивата на доза се избират в зависимост от трите резултата от острия тест за забавена невротоксичност, както и от всички други налични данни за токсичност и кинетика на проучваното вещество. Избира се най-високата доза с цел индуциране на токсични ефекти, за предпочитане — забавена невротоксичност, без обаче да се стига до смъртен изход или видимо страдание. След това се избира постепенно намаляващ ред на дозовите нива с цел установяване на всеки един ефект, свързан с дозата, както и най-ниското ниво на доза, при което не се наблюдават странични ефекти.

▼B1.4.2.4. *Тест за определяне на граница*

Ако тест при ниво на доза от поне 1 000 mg/kg телесно тегло дневно, използвайки процедурите, описани в това проучване, не предизвиква видими токсични ефекти и ако не се очаква токсичност, изхождайки от данните за структурно свързани вещества, то тогава не е необходимо да се извършва проучване, използващо по-висока доза. Прилага се тестът за определяне на граници, освен ако излагането на хора показва необходимост от използване на по-високо ниво на доза.

1.4.2.5. *Период на наблюдение*

Всички животни се наблюдават поне един път дневно по време на периода на излагане, както и 14 дни след това, освен ако не са определени за дисекция.

1.4.3. **Процедура**

Животните се дозират с проучваното вещество седем дни седмично за период от 28 дни.

1.4.3.1. *Общо наблюдение*

Наблюденията започват веднага след излагането. Всички кокошки се наблюдават внимателно поне един път дневно, всеки ден от 28-дневния период на третиране, и в продължение на 14 дни след дозирането или до момента на убиване. Записват се всички симптоми на токсичност, включително начално време, вид, тежест и продължителност на поведенческите отклонения. Атаксията се измерва според обикновена скала за степени, състояща се от поне четири нива, парализите следва да се отбелязват. Поне два пъти седмично кокошките, определени за хистопатологично изследване, се извеждат извън клетките и се подлагат за период от време на форсирана двигателна активност, например изкачване на стълба, с цел улесняване откриването на минимални токсични ефекти. Морибундните животни и тези, изпитващи тежък дистрес или болка, се отстраняват, хуманно се убиват и се дисецират.

1.4.3.2. *Телесно тегло*

Всички животни се претеглят точно преди прилагане на проучваното вещество, след което — поне един път седмично.

1.4.3.3. *Биохимия*

Шест кокошки, случайно подбрани от всяка една третирана група и контролната на средата група, следва да бъдат убити в рамките на няколко дни след последната доза; приготвят се хистологични препарати от главния мозък и поясната част на гръбначния мозък, които се изследват за инхибираща активност на таргетната за невропатия естераза (NTE). В допълнение би било полезно да се запази и изследва тъкан от нервус ишиадикус за инхибираща активност на таргетната за невропатия естераза (NTE). Обикновено на 24-ия и 48-ия час след прилагане на последната доза се убиват по три птици от контролната и всяка една от третираните групи. Ако данните от проучването за остра токсичност или други проучвания (напр. токсикокинетични) установяват, че по-подходящи за убиване след последната доза, са други времена, то тогава се следват тези времена и причините за промяната се документират.

Върху тези препарати може да се изследва и активността на ацетилхолинестеразата (AChE), ако се прецени, че е уместно. Спонтанна реактивация на AChE може да настъпи *in vivo* и така да доведе до подценяване на способността на веществото като AChE инхибитор.

▼B1.4.3.4. *Макроскопска дисекция*

Извършва се макроскопска дисекция на всички животни (определени за убиване и убити в морибундно състояние), която включва описание на изгледа на главния и гръбначния мозък.

1.4.3.5. *Хистопатологично изследване*

Нервната тъкан на животните, преживели периода на наблюдение и неизползвани за биохимични проучвания, се подлагат на микроскопско изследване. Тъканите се фиксират *in situ*, като се използват перфузионни техники. Препаратите следва да включват малкия мозък (срединен надлъжен срез), продълговатия мозък, гръбначния мозък и периферни нерви. Материал от гръбначния мозък се взема на ниво горен шийен отдел, средногръден и лумбо-сакрален. Взема се и материал от дисталния отдел на тибиалния нерв и неговите клонове към мускулулус гастрокнемиус и нервус ишиадикус. Препаратите се оцветяват съответно и специфично за миелин и аксон. Първоначално се извършва микроскопско изследване на препаратите от тъкани на всички животни от контролната и групата, получила висока доза. Ако се намерят доказателства за ефекти в групата с висока доза, следва да се извърши микроскопско изследване и при кокошките от групите, получили средна и ниска доза.

2. **ДАНИИ**

Отрицателните резултати за крайните цели, избрани за този метод (биохимия, хистопатология и наблюдение на поведението), обикновено не изискват по-нататъшно тестване за забавена невротоксичност. Еднозначните или неинформативните резултати по отношение на тези крайни цели могат да наложат по-нататъшно уточняване.

Предоставят се индивидуалните данни. В допълнение, всички данни са обобщават в таблична форма, показваща за всяка опитна група: броя на животните в началото на теста, броя на животните, показали увреждания, поведенчески или биохимични отклонения, вид и тежест на тези увреждания или ефекти, както и процент на животните, показали определен тип и тежест на уврежданията или ефекта.

Находките от това проучване се оценяват от гледна точка на честота, тежест и взаимна връзка между поведенческите, биохимичните и хистопатологичните ефекти, както и всеки друг наблюдаван ефект в третираните и контролната групи.

Числовите резултати следва да бъдат оценени чрез съответни и общоприети статистически методи. Статистическите методи се подбират по време на проектирането на проучването.

3. **ДОКЛАДВАНЕ****ДОКЛАД ЗА ТЕСТА**

Докладът за теста следва да съдържа, по възможност, следната информация:

Опитни животни:

— използвани породи;

— брой и възраст на животните;

— източник, условия на отглеждане, хранене, и т.н.;

— индивидуално тегло на животните в началото на теста.

▼B

Условия на теста:

- подробности относно приготвяне на проучваното вещество, стабилност и хомогенност, където е възможно;
- обосновка за избор на средата;
- подробности относно прилагане на проучваното вещество;
- подробности относно качество на храната и водата;
- обосновка за избора на доза;
- спецификация на приложените дози, включително подробности за средата, обема и физичната форма на прилаганото вещество;
- обосновка за избора на друго време, различно от 24-и и 48-и час, за извършване на биохимични изследвания.

Резултати:

- данни за телесното тегло;
- данни за отговора към токсичност според групата, включително и смъртност;
- липса на наблюдавани странични ефекти;
- същност, тежест и продължителност на клиничните наблюдения (обратимост на наблюдаваното или не);
- подробно описание на биохимичните методи и находки;
- находки при дисекцията;
- подробно описание на всички хистопатологични данни;
- статистическа обработка на резултатите, където е уместно.

Обсъждане на резултатите.

Изводи.

4. **ПРЕПРАТКИ**

Този метод е еднакъв с OECD TG 419.

▼B

Б.39. **ИЗПИТВАНЕ ЗА НЕРЕПАРАТИВЕН СИНТЕЗ НА ДНК (НСД) С ЧЕРНОДРОБНИ КЛЕТКИ ОТ БОЗАЙНИЦИ *IN VIVO***

1. **МЕТОД**

Настоящият метод е изцяло подобен на теста за нерепаративен синтез на ДНК (НСД) с чернодробни клетки от бозайници *in vivo* на OECD TG 486 от 1997 г.

1.1. **ВЪВЕДЕНИЕ**

Целта на теста за нерепаративен синтез на ДНК (НСД) с чернодробни клетки от бозайници *in vivo* е да се идентифицират тествани вещества, които индуцират репарация на ДНК в чернодробните клетки на третираните животни (вж. 1, 2, 3, 4).

Настоящият *in vivo* тест осигурява метод за изследване на генотоксичните ефекти на химикали в черния дроб. Измерената крайна точка показва увреждане на ДНК и последваща репарация в чернодробни клетки. По принцип черният дроб е главната площадка на метаболизма на абсорбираните съединения. Ето защо той е подходящото място за измерване на увреждане на ДНК *in vivo*.

Ако има доказателства, че тестваното вещество няма да достигне тъкан, която е обект на изследването, не е уместно да се използва настоящият тест.

Крайната точка на нерепаративния синтез на ДНК (НСД) се измерва чрез определяне на поглъщането на радиоактивно маркирани нуклеозиди в клетки, които не претърпяват репаративен синтез на ДНК (S-фаза). Най-широко използваният способ е определянето на поглъщането на маркирания с тритий тимидин ³H-TdR) чрез автордиография. За НСД тестове *in vivo* се предпочита черен дроб на плъхове. Освен черен дроб могат да се използват други тъкани, но те не са обект на настоящия метод.

Откриването на НСД реакция зависи от ДНК базите, изрязани и заместени от страната на увреждането. Следователно тест НСД е особено ценен за откриване на „репарация с дълги парчета“ (20 до 30 бази), индуцирана от вещество. И обратното, „репарация с къси парчета“ (една до три бази) се открива с много по-ниска чувствителност. Освен това мутагенните събития могат да се случат поради липса на репарация, погрешна репарация или погрешна репликация на ДНК поражения. Степента на НСД реакция изобщо не показва надеждността на процеса на репарация. В допълнение на това възможно е мутаген да реагира с ДНК, но увреждането на ДНК не се коригира чрез процеса на ексцизионна репарация. Липсата на конкретна информация за мутагенната активност от НСД теста се компенсира от потенциалната чувствителност на тази крайна точка, тъй като се измерва в целия геном.

Вижте също Общо въведение, част Б.

1.2. **ДЕФИНИЦИИ**

Клетки в репарация: нето ядрено зрънце (НЯЗ), по-голямо от предварително определена стойност, която се доказва в лабораторията, провеждаща теста.

Нето ядрени зрънца (НЯЗ): количествена мярка за НСД активност на клетки в автордиографни НСД тестове, изчислявана чрез изваждане на средния брой цитоплазмени зрънца на цитоплазмени зони, еквивалентни на ядрото (ЦЗ), от броя на ядрени зрънца (ЯЗ): $НЯЗ = ЯЗ - ЦЗ$. НЯЗ количества се изчисляват за отделните клетки и след това се групират за клетките в култура, паралелни култури и др.

▼B

Нерепаративен синтез на ДНК (НСД): ДНК репаративен синтез след ексцизията и отстраняването на участък от ДНК, съдържащ област на увреждане, индуцирано от химични вещества или физически агенти.

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕТО

НСД тестът *in vivo* с чернодробни клетки от бозайници показва ДНК репаративен синтез след ексцизията и отстраняването на участък от ДНК, съдържащ област на увреждане, индуцирано от химични вещества или физически агенти. Обикновено тестът се базира на включването на $^3\text{H-TdR}$ в ДНК на чернодробни клетки, които имат ниска честота на клетки в S-фазата на клетъчния цикъл. Поглъщането на $^3\text{H-TdR}$ обикновено се определя чрез автордиография, тъй като този способ не е чувствителен към интерференция от страна на клетки в S-фаза, както например течното сцинтилационно броене.

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.4.1. Подготовка

1.4.1.1. Избор на животински вид

Най-често се използват плъхове, въпреки че всеки подходящ вид от бозайници може да се използва. Следва да се вземат общо използваните лабораторни щамове на млади, здрави, пораснали животни. В началото на изследването вариациите в теглото на животните следва да е минимално и да не превишават $\pm 20\%$ от средното тегло на всеки пол.

1.4.1.2. Условия на отглеждане и хранене

Прилагат се общите условия в Общото въведение към част Б, въпреки че целта е влажността на въздуха да е от 50 до 60 %.

1.4.1.3. Подготовка на животните

Здрави, млади, пораснали животни се определят на произволен принцип за контролните и опитните групи. Клетките следва да се подредят така, че да се намалят до минимум евентуалните ефекти от разполагането им. На животните се дава уникална идентификация и се държат в клетките поне пет дни преди началото на изследването, за да се аклиматизират към лабораторните условия.

1.4.1.4. Тествано вещество/приготвяне

Твърдите вещества за теста следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители и, ако е необходимо, да се разреждат преди даване на дозата на животните. Течните вещества за теста могат да се дават директно или да се разреждат преди дозиране. Следва да се използват пресни препарати на тестваното вещество, освен ако данните за стабилността му не показват, че може да се съхранява.

1.4.2. Условия за провеждане на теста

1.4.2.1. Разтворител/носител

Разтворителят/носител не следва да има токсично въздействие с използваните нива на дозиране, а също така не следва да има съмнения за химическа реакция между него и тестваното вещество. Ако се използват различни от добре познатите разтворители/носители, включването им в теста следва да се подкрепи от данни за съвместимостта им. Препоръчва се, винаги когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на воден разтворител/носител.

▼B1.4.2.2. *Контроли*

Паралелни положителни и отрицателни контроли (разтворител/носител) следва да се включат във всяка отделно провеждана част от експеримента. С изключение на третирането с тестваното вещество, с животните в контролните групи следва да се борави по същия начин както с животните от опитните групи.

Положителните контроли следва да са вещества, за които се знае, че генерират НСД, когато се администрират на нива на експозиция, от които се очаква да се получи забележимо увеличение спрямо общия фон. Положителните контроли, които имат нужда от метаболитна активация, следва да се използват с дози, предизвикващи умерена реакция (4). Дозите могат да са така избрани, че ефектите да са ясни, но да не разкриват непосредствено на четеца идентичността на кодираните предметни стъкла. Примерите за положителни контролни вещества включват:

Времетраене на вземането на проби	Вещество	CAS №	EINECS №
Ранни (от 2 до 4 часа)	N-нитрозодиметиламин	62-75-9	200-249-8
Късни (от 12 до 16 часа)	N-2-флуоренилацетамид (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Могат да се използват други подходящи положителни контролни вещества. Приемливо е положителните контроли да се администрират по начин, различен от тестваното вещество.

1.5. ПРОЦЕДУРА

1.5.1. **Брой и пол на животните**

Следва да се използва адекватен брой животни, за да се вземе предвид естественото биологично вариране на реакцията към теста. Броят на животните следва да е минимум три анализируеми животни на група. Когато има натрупана значителна база данни от предишни изследвания, за паралелните отрицателни и положителни контролни групи се изисква само едно или две животни.

Ако в момента на изследването има налични данни от изследвания, проведени със същия вид и със същия начин на експозиция, показващи, че няма съществени разлики по отношение токсичността между половете, тогава тестването на един пол, за предпочитане мъжки, е достатъчно. Когато експозицията на хора към химикали може да е специфична в зависимост от пола, като например към някои фармацевтични агенти, тестът следва да се проведе с животни от подходящия пол.

1.5.2. **График на третиране**

Тестваните вещества по принцип се администрират като еднократно третиране.

1.5.3. **Нива на дозиране**

Нормално се използват две нива на дозиране. Най-високата доза се дефинира като доза, създаваща признаци на такава токсичност, че от по-високи нива на дозиране, базирани на същия режим, би могло да се очаква да доведат до леталност. По принцип по-ниската доза следва да бъде от 50 % до 25 % от високата доза.

▼B

Вещества със специфични биологични активности при ниски, нетоксични дози (като хормони и митогени) могат да бъдат изключени от критериите за определяне на дозата и следва да се оценяват за всеки конкретен случай. Ако се извършва изследване за обхват поради това, че няма подходящи данни в наличност, то следва да е в същата лаборатория, като се използват същият вид, щам, пол и режим на третиране както в главното изследване.

Най-високата доза може също да се дефинира като доза, показваща известни признаци на токсичност в черния дроб (напр. пикнотични ядра).

1.5.4. Граничен тест

Ако тест с едно ниво на дозиране от минимум 2 000 mg/kg телесно тегло при еднократно третиране или две третираня в един и същи ден не дава забележими токсични ефекти, а не би могла да се очаква генотоксичност на базата на данни от структурно свързани вещества, то тогава пълно изследване може да не се счита за необходимо. Очакваната експозиция на хора може да покаже необходимост в граничния тест да се използва по-високо ниво на дозиране.

1.5.5. Администриране на дозите

Тестваното вещество обикновено се дава със стомашна сонда, като се използва тръба или подходяща интубационна канюла. Други начини на експозиция са приемливи, ако могат да бъдат обосновани. Все пак интраперитонеалният път не се препоръчва, тъй като той би изложил черния дроб директно на въздействието на тестваното вещество, а не през системата на кръвообращението. Максималният обем течност, който може да се вкара еднократно със стомашна сонда или инжекция, зависи от големината на опитното животно. Обемът не следва да превишава 2 ml/100g телесно тегло. Обеми, по-високите от тези, следва да се обосноват. С изключение на дразнещи или корозивни вещества, които нормално дават изострящи ефекти при по-високи концентрации, променливостта на тестовия обем следва да се сведе до минимум чрез регулиране на концентрацията с цел осигуряване на постоянен обем на всички нива на дозиране.

1.5.6. Подготовка на чернодробните клетки

Чернодробните клетки се подготвят от третирани животни нормално от 12 до 16 часа след дозиране. По принцип е необходимо по-ранно вземане на проба (нормално от два до четири часа след третиране), освен ако няма ясна положителна реакция на 12-ия до 16-ия час. Все пак може да се практикува вземане на проби и по друго време, когато това е обосновано на базата на токсикокинетични данни.

Краткосрочни култури на чернодробни клетки от бозайници обикновено се създават чрез обливане на черния дроб *in situ* с колагеназа, като прясно дисоциираните клетки се оставят да се прирепят към подходяща повърхност. Чернодробните клетки от отрицателни контролни животни следва да имат жизнеспособност (5) минимум 50 %.

1.5.7. Определяне на НСД

Прясно изолираните чернодробни клетки от бозайници се инкубират обикновено със среда, съдържаща ³H-TdR, за подходящ период от време, напр. от три до осем часа. В края на инкубационното време средата следва да се отстрани от клетките, които след това се инкубират със среда, съдържаща голямо количество немаркиран тимидин, за да се намали неабсорбираната радиоактивност („студено отстраняване“). След това клетките се изплакват, фиксират и изсушават. При по-продължително инкубационно време студено отстраняване може и да не е необходимо. Предметните стъкла се потопяват в автордиографична емулсия, експонират се на тъмно (напр. държат се в хладилник от 7 до 14 дни, проявяват се, оцветяват се и експонират сребърни зрънца се преброяват. От всяко животно се подготвят две до три предметни стъкла.

▼B**1.5.8. Анализ**

Препаратът на предметното стъкло следва да съдържа достатъчно клетки с нормална морфология, за да може да се направи пълноценна оценка на НДС. Препаратите се изследват под микроскоп за признаци на явно изразена цитотоксичност (напр. пикноза, намалени нива на радиоактивно маркиране).

Предметните стъкла се кодират преди преброяването на зрънцата. Нормално 100 клетки се изследват от всяко животно от най-малко две предметни стъкла; база за отчитане на резултатите от по-малко от 100 клетки на животно следва да бъде обоснована.

Не се отчитат количествата зрънца за ядра в S-фаза, но пропорцията клетки в S- фаза може да се регистрира.

Количеството на $^3\text{H-TdR}$, въведено в ядрата и цитоплазмата на морфологично нормални клетки, по начина, по който се проявява чрез отлагането на сребърни зрънца, следва да се определи чрез подходящи методи.

2. ДАННИ**2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИ**

Следва да се представят индивидуални данни за всяко предметно стъкло и животно. В допълнение на това всички данни следва да се резюмират в таблица. Следва да се изчислят количествата на нето ядрените зрънца (НЯЗ) за всяка клетка, за всяко животно и всяка доза и време чрез изваждане на ЦЗ бройки от ЯЗ бройки. Ако се броят „клетки в репарация“, критериите за дефиниране на „клетки в репарация“ следва да се обосноват и да се базират на паралелни отрицателни контролни данни или на такива от предишни изследвания. Цифровите резултати могат да се оценяват чрез статистически методи. Ако се използват, статистическите тестове следва да се подберат и обосноват преди провеждане на изследването.

2.2. ОЦЕНКА И ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Примерите на критерии за положителни/отрицателни реакции включват:

- | | | |
|-------------|-----|---|
| положителни | i) | НЯЗ стойности над зададен праг, обоснован на базата на лабораторни данни от предишни изследвания; или |
| | ii) | НЯЗ стойности, значително по-високи от паралелни контроли; |
| отрицателни | i) | НЯЗ стойности в границите на/под контролен праг от предишни изследвания; или |
| | ii) | НЯЗ стойности, незначително по-високи от паралелни контроли. |

▼B

Следва да се разгледа биологическата значимост на данните: т.е. параметри като изменчивост между животните, взаимодействие между съотношението доза-реакция и цитотоксичност следва да се вземат под внимание. При оценката на резултатите от теста като помощно средство биха могли да се използват статистически методи. Статистическата значимост не следва да е единственият решаващ фактор за положителна реакция.

Въпреки че повечето експерименти дават ясно положителни или отрицателни резултати, в редки случаи наборът данни изключва правенето на категорична преценка за активността на тестваното вещество. Резултатите могат да останат двузначни или под въпрос, независимо от това колко пъти е повторен опитът.

Положителен резултат от теста за нерепаративен синтез на ДНК (НСД) с чернодробни клетки от бозайници *in vivo* показва, че увреждането на ДНК с чернодробни клетки от бозайници *in vivo* може да се репарира чрез нерепаративен синтез на ДНК *in vivo*. Отрицателният резултат показва, че при условията за провеждане на теста тестваното вещество не индуцира ДНК увреждане, което се открива с настоящия тест.

Следва да се обсъди вероятността тестваното вещество да достигне общото кръвообращение или конкретно прицелната тъкан (напр. системна токсичност).

3. ДОКЛАДВАНЕ

ДОКЛАД ЗА ТЕСТА

Докладът за теста трябва да включва следната информация:

Разтворител/носител:

- обосновка за избора на носител,
- разтворимост и стабилност на тестваното вещество в разтворител/носител, ако са известни.

Опитни животни:

- вид/щам,
- брой, възраст и пол на животните,
- източник, условия на отглеждане, начин на хранене и др.,
- индивидуално тегло на животните в началото на теста, в т.ч. обхват на телесното тегло, средно и стандартно отклонение за всяка група.

Условия за провеждане на теста:

- положителни и отрицателни носител/разтворител контроли,
- данни от изследването за установяване на обхват, ако е проведено,
- основна причина за избора на нивото на дозата,
- подробности за приготвянето на тестваното вещество,
- подробности за администрирането тестваното вещество,
- основна причина за начина на администриране,
- методи за проверка дали тестваният агент е достигнал общото кръвообращение или тъканта, която е обект на изследването, ако са приложими,

▼B

- преминаване от концентрация (ppm) на тестваното вещество в храната/питейната вода към действителната доза (mg/kg телесно тегло), ако е приложимо,
- подробности за качеството на храната и водата,
- подробно описание на графициите на третиране и вземане на проби,
- методи на измерване на токсичността,
- метод на подготовка на чренодробни клетки и култура,
- използван автордиографичен способ,
- брой на подготвените предметни стъкла и брой на отчетените клетки,
- критерии за оценка,
- критерии за считане на изследванията положителни, отрицателни или двузначни.

Резултати:

- средни стойности на индивидуално предметно стъкло, животно и група за ядрени зрънца, цитоплазмени зрънца и нето ядрени зрънца,
- взаимоотношение доза-реакция, където е възможно,
- статистическа оценка, ако има такава,
- признаци на токсичност,
- паралелни отрицателни (разтворител/носител) и положителни контролни данни,
- отрицателни (разтворител/носител) от предишни изследвания и положителни контролни данни с обхват, средни стойности и стандартни отклонения,
- брой на „клетки в репарация“, ако е определен,
- брой клетки в S-фаза, ако е определен,
- жизнеспособност на клетките.

Обсъждане на резултатите.

Заклучения.

4.

Препратки

- (1) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 156, pp. 1—18.
- (2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the In Vivo Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 123—133.
- (3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds.), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part II revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52—77.

▼B

- (4) Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo, *Mutations Res.*, 312, pp. 263—285.
- (5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res.*, 291, pp. 21—27.
- (6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the In Vivo/In Vitro Hepatocyte DNA Repair Assay, *Environ Mutagen*, 4, pp. 553—562.

▼B**Б. 40. *IN VITRO* КОЖНА КОРОЗИЯ: ТРАНСКУТАННО ИЗМЕРВАНЕ НА ЕЛЕКТРИЧЕСКОТО СЪПРОТИВЛЕНИЕ НА КОЖАТА (TER)****1. МЕТОД**

Този метод за измерване е еквивалентен на OECD TG 430 (2004).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Кожната корозия се отнася до причиняването на необратими тъкани увреждания на кожата вследствие на прилагането на материал на изпитване (както е дефинирано от Глобалната хармонизирана система за класификация и етикетирание на химични вещества и смеси (GHS) (1). Този метод осигурява процедура, при която оценката на корозивността не се извършва върху живи животни.

Оценката на кожната корозивност обикновено включва използване на лабораторни животни (2). Загрижеността за болката и страданието на животните, подложени на тази процедура, се разглежда в ревизирания метод на изпитване Б.4, позволяващ определянето на корозията чрез използването на алтернативни, *in vitro* методи, избягващи болката и страданието.

Първата стъпка към дефинирането на алтернативните изпитвания, които биха могли да се използват за изпитване за кожна корозивност за законодателни цели, бе провеждането на предварителни валидиращи изследвания (3). След това бе проведено официалното валидиращо изследване на *in vitro* методите за оценка на кожната корозия (4)(5) (6)(7)(8). Резултатът от тези изследвания и друга публикувана литература доведе до препоръката да бъдат използвани следните изпитвания при оценката *in vivo* на кожната корозивност (9)(10)(11): изпитване върху модел на човешка кожа (виж също метод на изпитване Б.40А и транскутанното изпитване за електрическо съпротивление (този метод).

Валидиращото изследване и други публикувани изследвания сочат, че на транскутанното изпитване за електрическо съпротивление (TER) при плъхове (12)(13) може надеждно да разграничи познати кожни корозиви и некорозиви (5)(9).

Изпитването, описано в този метод, позволява идентифицирането на корозивни химични вещества и смеси. Освен това, то дава възможност за идентифициране на некорозивните вещества и смеси, когато това се подкрепя от доказателствено определяне с помощта на друга съществуваща информация (например рН, структурно-активни взаимовръзки, човешки и/или животински данни) (1)(2)(11)(14). То не осигурява информация за кожните дразнения, нито пък ни позволява да направим подкатегоризация на корозивните вещества, както ни разрешава Глобалната хармонизирана система за класификация (GHS) (1).

За пълната оценка на локалните кожни ефекти се препоръчва, след еднократно дермално излагане да се следва последователна стратегия на изпитване, както е посочено в приложението към метод на изпитване Б.4 (2) и както се изисква от Глобалната хармонизирана система (1). Тази стратегия на изпитване включва провеждането на изпитване *in vitro* за корозия на кожата (както е описано в този метод) и кожно дразнение преди да се обмисля изпитване върху живи животни.

▼B

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Кожна корозия *in vivo* е причиняването на необратимо увреждане на кожата, а именно, видима некроза през епидермиса и вътре в дермиса, вследствие прилагането на вещество за изпитване за период до четири часа. Типични корозивни реакции са язви, кървене, кървящи струпеи и до края на наблюдението, продължаващо 14 дена, обезцветяване, дължащо се на избледняване на кожата, цялостни повърхности на алоpecia и белези. Хистопатологията също трябва да се вземе под внимание при оценката на спорните лезии.

Транскутанното електрическо съпротивление (TER) е мярка за електрическия импеданс на кожата, измерен като съпротивление в кОм (kilo Ohms). Един прост и сигурен метод за оценка на бариерната функция чрез регистриране на преминаването на йони през кожата с помощта на измервателния мост на Уитстоун.

1.3. РЕФЕРЕНТНИ ВЕЩЕСТВА

Таблица 1

Референтни химически вещества

Име	EINECS No	CAS No	
1,2-Диаминопропан	201-155-9	78-90-0	Силно корозивен
Акрилна киселина	201-177-9	79-10-7	Силно корозивен
2-терт. бутилфенол	201-807-2	88-18-6	Корозивен
Калиев хидроксид (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Корозивен
Сярна киселина (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Корозивен
Октанова киселина (каприлна киселина)	204-677-5	124-07-02	Корозивен
4-амино-1,2,4-триазол	209-533-5	584-13-4	Некорозивен
Еугенол	202-589-1	97-53-0	Некорозивен
Фенетил бромид	203-130-8	103-63-9	Некорозивен
Тетрахлоретилен	204-825-9	27-18-4	Некорозивен
Изостеаринова киселина	250-178-0	30399-84-9	Некорозивен
4-(метилдио)-бензалдеhid	222-365-7	3446-89-7	Некорозивен

Повечето от химическите вещества, изброени по-горе, са взети от списъка на химикали, избрани за международното валидиращо изследване на ECVAM (4). Техният избор е въз основа на следните критерии:

- i) равен брой корозивни и некорозивни вещества;

▼B

- ii) търговско налични вещества, обхващащи повече от съответните химични класове;
- iii) включване на силно корозивни, както и на по-малко корозивни вещества, за да се позволи разделяне, въз основа на корозивната сила;
- iv) избор на химически вещества, с които да може да се работи в лабораторни условия, без да има излагане на други сериозни рискове, освен на корозивност.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

Материалът на изпитването се прилага за период до 24 часа върху епидермалните повърхности на кожните дискове в опитната постановка с две отделения, при която кожните дискове функционират като преграда между двете отделения. Кожните дискове се вземат от хуманно убити плъхове на възраст 28—30 дни. Корозивните материали се идентифицират по способността си да предизвикват загуба на нормалната цялост на *stratum corneum* и бариерната функция, която се изразява като намаление на TER под нивото на прага (12). За плъховете за гранична TER се избира стойност от 5 k Ω , като това се основава на голям брой данни за широк кръг химически вещества, при които по-голямата част от стойностите са или определено над (често > 10 k Ω), или доста под (често < 3 k Ω) тази стойност (12). Като цяло, материалите, които не са корозивни, но са дразнещи или недразнещи при животните, не намаляват TER под тази референтна стойност. Нещо повече, използването на кожни препарати или друга апаратура може да промени граничната стойност, като изисква допълнително валидиране.

Етап за фиксиране на оцветител е включен в процедурата за изпитване за потвърждение на положителните резултати от TER, включващи стойности около 5 k Ω . Етапът с фиксиране на оцветител определя дали увеличаването на йонната проникваемост се дължи на физическо разрушаване на *stratum corneum*. Методът TER, използващ кожа от плъхове, показва, че с него могат да се правят предвиждания за *in vivo* корозивността при зайци, оценявана с помощта на метода за изпитване Б.4 (2). Трябва да се отбележи, че изпитването *in vivo* при зайци е високо консервативен по отношение на кожната корозивност и дразненето на кожата, когато се сравни с изпитването върху модел на човешка кожа (15).

1.5. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

1.5.1. Животни

Плъховете са избраният биологичен вид, тъй като чувствителността на кожата им към химическите вещества в това изпитване е била демонстрирана преди това (10). Възрастта (когато се взема кожата) и породата на плъха са особено важни, за да е сигурно, че фоликулите на козината им са в латентна фаза преди да започне растежа на козината.

▼B

Дорзалната и странична козина от млади, на възраст около 22 дни, мъжки и женски плъхове (от породата Wistar или друга сравнима), внимателно се отстранява с малки пинцети. После животните се измиват с бавно бърсане, като захваната повърхност се потапя в антибиотичен разтвор (съдържащ например стрептомицин, пеницилин, хлорамфеникол и амфотерицин, при концентрации, ефективни за инхибирането на бактериалния растеж). Животните се измиват с антибиотици отново на третия или четвъртия ден след първото измиване и се използват до три дни след второто миене, когато *stratum corneum* е възстановен от отстраняването на козината.

1.5.2. Подготовка на кожните дискове

Животните са убити по хуманен начин на възраст 28—30 дена; тази възраст е критична. Дорзо-латералната кожа на всяко едно животно се отстранява и от нея се премахва излишната подкожна мазнина чрез внимателно обелване и отделяне от кожата. Кожните дискове, всеки от които с диаметър от приблизително 20 mm, се отстраняват. Кожата може да се съхрани, преди да се използват дисковете, когато е показано, че положителните и отрицателни контролни данни са еквивалентни на тези, получени от прясна кожа.

Всеки кожен диск се поставя над единия от краищата на PTFE (политетрафлуороетиленова) тръба, като се внимава епидермалната повърхност да бъде в контакт с тръбата. Гумен О-пръстен се прикрепва с натиск в края на тръбата, за да държи кожата, без тя да мърда, а излишната тъкан се изрязва. Размерите на тръбата и О-пръстена са показани на фигура 2. Гуменият О-пръстен внимателно се запечатва в края на PTFE тръбата с петролно желе. Тръбата се поддържа от пружинена шипка вътре в рецепторната камера, съдържаща разтвор $MgSO_4$ (154 mM) (фигура 1). КОЖНИЯТ ДИСК трябва да бъде напълно потопен в разтвора $MgSO_4$. От един единствен плъх могат да се получат 10—15 кожни диска.

Преди да започне изпитването, електрическото съпротивление на двата кожни диска се измерва като процедура за качествен контрол за всяка животинска кожа. И двата диска трябва да показват стойности на съпротивление по-високи от 10 K Ω , за да могат останалите дискове да се използват за изпитването. Ако стойността на съпротивлението е по-ниска от 10 K Ω , останалите дискове от тази кожа, не могат да се използват.

1.5.3. Прилагане на изпитването и контролни вещества

За всяко изследване трябва да се използват едновременно положителни и отрицателни контроли, за да се осигурят адекватни резултати от експерименталния модел. Трябва да се използват кожни дискове от едно единствено животно. Предлаганите положителни и отрицателни контролни вещества са съответно 10 M солна киселина и дестилирана вода.

Течните вещества на изпитване (150 μ L) се прилагат равномерно върху епидермалната повърхност вътре в тръбата. Когато се изпитват твърди материали, достатъчно количество от него се разпределя равномерно по диска, за да се гарантира, че е покрита цялата повърхност на епидермиса. Добавя се дейонизирана вода (150 μ L) върху твърдото вещество и тръбата леко се разклаща. За да се постигне максимален контакт с кожата, може да се наложи твърдото вещество да се нагрее до 30 °C, за се разтопи или омекне изпитваното вещество, или пък да се разтроши и да стане на гранули или на прах.

▼B

За всяко изпитване се използват три кожни диска и контролно вещество. Изпитваните вещества се прилагат за период от 24 часа при температура 20—23 °C. Изпитваното вещество се отстранява чрез измиване със струя течаща вода до 30 °C, докато повече не може да се отстранява никакъв материал.

1.5.4. Измервания на TER

Кожният импеданс се измерва, като се измерва TER с помощта на променлив ток с ниско напрежение чрез измервателния мост на Уитстоун (13). Общите спецификации на измервателния мост са 1—3 Volt работно напрежение, синусоидално или правоъгълно променливо напрежение от 50—1 000 Hz и измервателен обхват от поне 0,1—30 K Ω . Измервателният мост се използва за валидиране на измерени индуктивност, капацитет, съпротивление до стойности от 2 000 H, 2 000 μ F, и 2 M Ω , съответно при честоти от 100 Hz или 1 kHz, като се използват серии от паралелни стойности. За целите на изпитването TER за корозивност, измерванията се записват като съпротивление, при честота от 100 Hz и като се използват серийни стойности. Преди измерването на електрическото съпротивление се намалява повърхностното напрежение на кожата, като се добавя достатъчен обем 70 % етанол, за да се покрие епидермиса. След няколко секунди етанолът се отстранява от тръбата и след това тъканта се хидратираща чрез добавяне на 3 ml разтвор на MgSO₄ (154 mM). Електродите на измервателния мост се поставят от двете страни на кожните дискове, за да може да се измери съпротивлението в k Ω /кожен диск (фигура 1). Измеренията и дължината на електродите под крокодилските щипки са показани на фигура 2. Щипката, прикрепена към вътрешния електрод, се поставя върху горния край на тръбата от PTFE по време на измерването на съпротивлението, за да може достатъчна дължина на електрода да бъде потопена в разтвора на MgSO₄. Външният електрод се позиционира вътре в рецепторната камера, така че да се опре на дъното на камерата. Разстоянието между пружинената щипка и дъното на PTFE тръбата се поддържа постоянно (фигура 2), тъй като това разстояние оказва влияние върху получената стойност на съпротивлението. Следователно, разстоянието между вътрешния електрод и кожния диск трябва да бъде постоянно и минимално (1—2 mm).

Ако измерваната стойност на съпротивлението е по-висока от 20 k Ω , това може да се дължи на отлагането на остатъци от веществото на изпитване по епидермалната повърхност на кожния диск. Може да се предприеме опит за по-нататъшното отстраняване на отлагането, например като се запечата PTFE тръбата с палец в ръкавица и като се разклати за около 10 секунди; разтворът на MgSO₄ се изхвърля и измерването на резистентността се повтаря с пресен разтвор.

Свойствата и размерите опитната постановка и опитната процедура могат да повлияят на получените стойности на TER. Корозивният праг от 5 k Ω е определен въз основа на данни, получени от специфичната опитна постановка и процедура, описани в този метод. Различни прагове и контролни стойности могат да бъдат прилагани, ако условията на изпитване се променят или се използва друга опитна постановка. Ето защо, е необходимо да се калибрира методологията и праговете стойности на съпротивлението, като се изпитат серии референтни стандарти, избрани от използваните химически вещества при валидиращото изследване (4)(5), или химични класове, подобни на изследваните. Набор от подходящи референтни химически вещества е показан в таблица 1.

▼ B

1.5.5. Методи за фиксиране на оцветител

Излагането на определени некорозивни материали може да доведе до намаляване на съпротивлението под границата от 5 k Ω , като това позволява преминаването на йоните през *stratum corneum*, като по този начин се намалява електрическото съпротивление (5). Например, неутралните неорганични вещества и веществата, които имат повърхностно-активни свойства (включително детергенти, емулсификатори и други повърхностноактивни вещества) могат да отстранят кожните мазнини, като по този начин направят бариерата по-лесно проницаема за йоните. Така, ако стойностите TER на изпитваните вещества са по-ниски или около 5 k Ω при липса на видимо увреждане, трябва да се направи оценка на проникването на оцветяващото вещество върху контролните и третираните тъкани, за да се определи дали получените TER стойности са в резултат на повишена кожна проницаемост или на кожна корозия (3)(5). Във втория случай, когато *stratum corneum* е разкъсан, когато се приложи към кожната повърхност бързо, оцветителят сулфорходамин В (sulforhodamine В) прониква и оцветява подлежащата тъкан. Този конкретен оцветител е устойчив на широк обхват от химически вещества и не се влияе от процедурата на екстракция, описана по-долу.

1.5.5.1. Приложение и отстраняване на оцветителя сулфорходамин В (sulforhodamine В)

След провеждане на измерването на TER магнезиевият сулфат се отстранява от тръбата и кожата се изследва внимателно за видими увреждания. Ако няма голямо очевидно увреждане оцветителят сулфорходамин В (Кисело червено 52; С.І. 45100; EINECS номер 222-529-8; CAS номер 3520-42-1), 150 μ L от 10 % (w/v) разтвор в дестилирана вода, се нанася върху епидермалната повърхност на всеки кожен диск за период от 2 часа. Тези кожни дискове след това се измиват в течаща вода при стайна температура, приблизително за 10 секунди, за да се премахне излишния/несвързан оцветител. Всеки кожен диск внимателно се отстранява от PTFE тръбата и се поставя в контейнер (например 20 mL стъклен прозрачен контейнер), съдържащ деионизирана вода (8 mL). Контейнерите леко се разклащат за 5 минути, за да се отстрани всякакъв допълнителен несвързан оцветител. Тази процедура на изплакване се повтаря, след което кожните дискове се отстраняват и се поставят в контейнери, съдържащи 5 ml от 30 % (w/v) натриев додецил сулфат (SDS) в дестилирана вода и се инкубират за една нощ при температура 60 °C.

След инкубирането всеки кожен диск се отстранява и изхвърля, а останалата част от разтвора се центрофугира около 8 минути при 21 °C (относителна центробежна сила ~175 x g). Проба от 1 ml от супернатанта се разтваря в 1 от 5 (v/v) (т.е. 1 mL + 4 mL) с 30 % (w/v) SDS в дестилирана вода. Оптичната плътност (OD) на разтвора се измерва при 565 nm.

1.5.5.2. Изчисляване на съдържанието на оцветител

Съдържанието на оцветителя сулфорходамин В се изчислява от стойностите OD (5) (моларен коефициент на поглъщане на оцветителя сулфорходамин В при 565 nm = $8,7 \times 10^4$; молекулно тегло = 580). Съдържанието на оцветителя се определя за всеки кожен диск с помощта на калибрираща крива и тогава се изчислява средното съдържание на оцветител при тези потвърдителни експерименти.

2. ДАННИ

Стойностите на съпротивлението (k Ω) и средните стойности на съдържанието на оцветител (μ g/диск), където има такъв, за изпитвания материал, както за положителните, така и за отрицателните контроли, трябва да се докладват в таблична форма (данни от индивидуалното изпитание и средните стойности \pm S.D.), включително данни за потвърдителни/повторни експерименти, средни и индивидуални стойности.

▼B

2.1. ИНТЕРПРЕТИРАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Средните резултати за TER се приемат, ако едновременните положителни и отрицателни контролни стойности попадат в допустимите граници за метода в лаборатория за изпитване. Допустимите граници на съпротивлението за методологията и опитната постановка, описани по-горе, са дадени в следната таблица:

Контрола	Вещество	Съпротивление (к)
Положителна	10М Солна киселина	0,5—1,0
Отрицателна	Дестилирана вода	10—25

Средните резултати при оцветяване се приемат, при условие че едновременните контролни стойности попадат в допустимите граници за метода. Предлаганите приемливи обхвати на съдържанието на оцветител за контролните вещества за методологията и опитната постановка, описани по-горе, са дадени в следната таблица:

Контрола	Вещество	Съдържание на оцветител (µg/диск)
Положителна	10М Солна киселина	40—100
Отрицателна	Дестилирана вода	15—35

Изпитваното вещество се счита за некорозивно спрямо кожата:

- i) ако средната стойност на TER, получена за изпитваното вещество, е по-голяма от 5 kΩ, или
- ii) средната стойност на TER е по-малка или равна на 5 kΩ, и
 - кожният диск не показва никакви видими увреждания, и
 - средното съдържание на оцветител в диска е доста под средното съдържание на оцветител в 10М HCl положителна контрола, получена едновременно.

Изпитваното вещество се счита за корозивно спрямо кожата:

- i) ако средната стойност на TER е по-ниска или равна на 5 kΩ и кожният диск е очевидно увреден, или
- ii) средната стойност на TER е по-малка или равна на 5 kΩ, и
 - кожният диск не показва никакви видими увреждания, но
 - средното съдържание на оцветител в диска е по-голямо или равно на средното съдържание на оцветител в 10М HCl положителна контрола, получена едновременно.

▼B**3. ДОКЛАДВАНЕ****3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Протоколът от изпитването трябва да включва следната информация:

Изпитвани и контролни вещества:

- химичното наименование (наименования) като тези по IUPAC или CAS, CAS номер, ако е известен;
- чистота и състав на веществото или препаратата (в процент от теглото) и физична природа;
- физико-химични свойства като физично състояние, рН, стабилност, разтворимост във вода, имащи отношение за провеждане на изследването;
- обработване на изпитваните/контролните вещества преди изпитването, ако има такова (например загряване, смилане);
- стабилност, ако е известна.

Лабораторни животни:

- вид и пол;
- възраст на животните, когато са използвани като донори;
- източник, условия на отглеждане, хранене и др.;
- подробности по подготовката на кожата.

Условия на изпитване:

- калибриращи криви за опитната постановка;
- калибриращи криви за изпитването на оцветяване;
- подробности по използваната процедура на изпитване за измервания на TER;
- подробности по използваната процедура на изпитване за определяне на оцветяването, ако случаят е такъв;
- описание на всяко изменение на процедурата на изпитване;
- описание на използваните критерии за оценка.

Резултати:

- представяне в табличен вид на данните от изпитването за TER и за фиксиране на оцветител (ако случаят е такъв) за отделните животни и отделните кожни проби;
- описание на всички наблюдавани ефекти.

Обсъждане на резултатите.

Изводи.

4. ПРЕПРАТКИ

1. OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. [http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)6](http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6).

▼B

2. Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/Corrosion.
3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219—255.
4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. in Vitro 12, 471—482.
5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. in Vitro 12, 483— 524.
6. OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.
7. Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129—147.
8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf>
9. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275—280.
10. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epidocs/epis_brd.pdf.
11. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st - 2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat
12. Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test -modifications and validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 507—512.

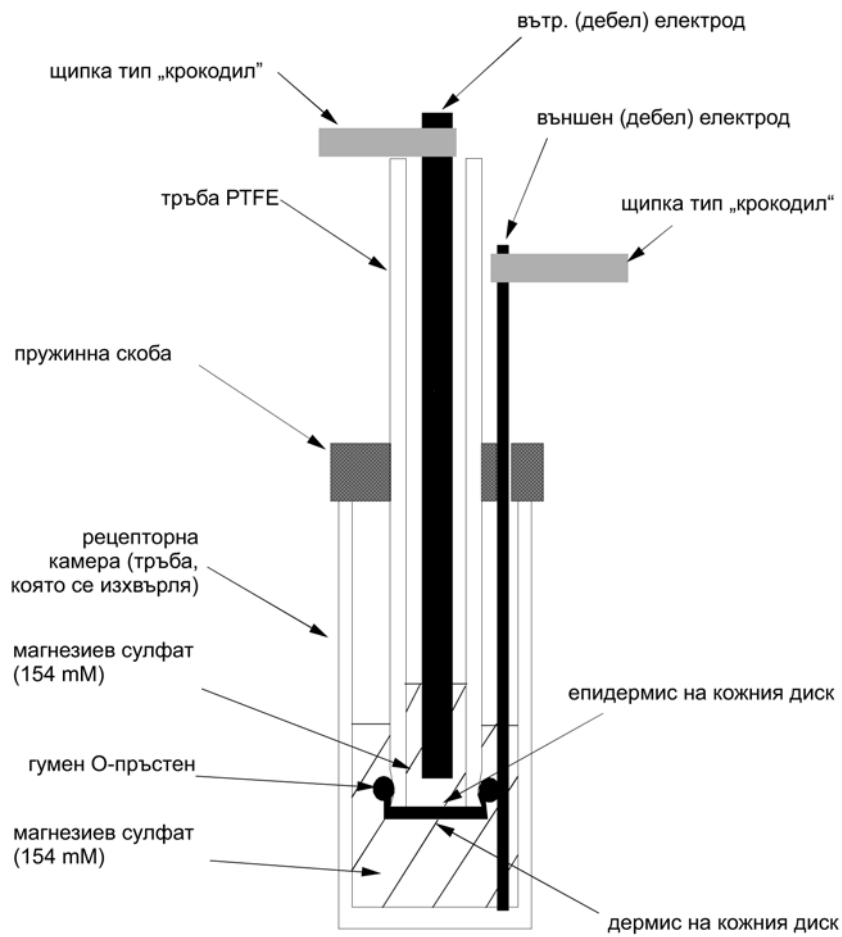
▼B

13. Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro*: results of an inter-laboratory trial. *Toxic. in vitro* 6, 191—194.
14. Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* 26: 709—720.
15. Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. *Fd. Chem. Toxicol.* 35, 845—852.
16. Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988). An In Vitro model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. *Toxic. in Vitro.* 2, 7—17.

▼ B

Фигура 1

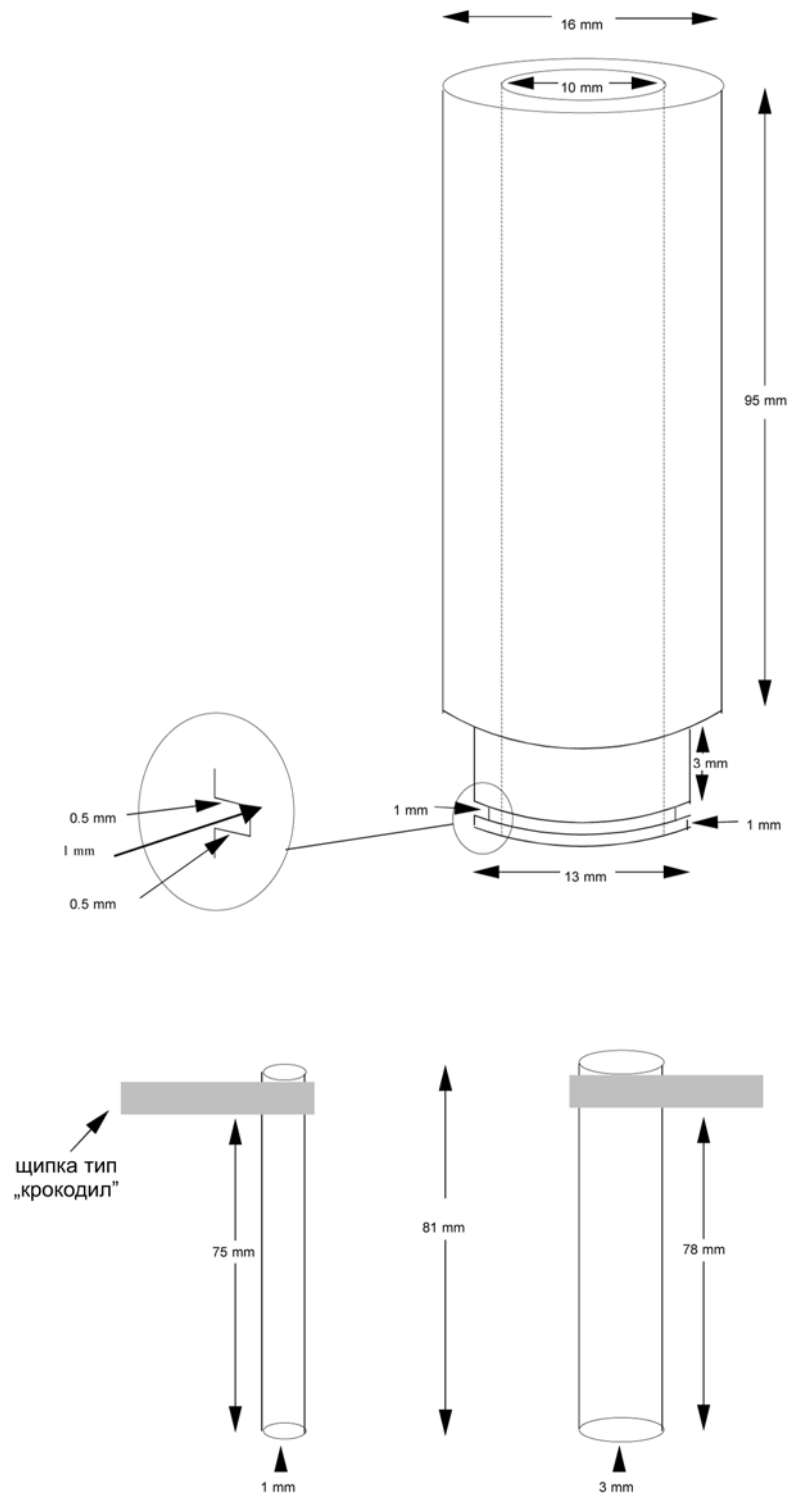
Опитна постановка за изпитване на TER върху кожа от плъхове



▼B

Фигура 2

Размери на използваните политетрафлуороетиленова (PTFE) и рецепторни тръби и електроди



▼B**Критични точки на опитната постановка, показана по-горе:**

- вътрешният диаметър на тръбата PTFE,
- дължина на електродите, подходяща за PTFE тръбата и рецепторната тръба, такава, че кожният диск да не се докосва от електродите и такава, че електрод със стандартна дължина да е в контакт с разтвора на MgSO₄;
- количеството разтвор на MgSO₄ в рецепторната тръба трябва да образува такава дълбочина, че да съответства на нивото в PTFE тръбата, както е показано на фигура 1;
- кожният диск трябва да бъде достатъчно добре закрепен за PTFE тръбата, така че електрическото съпротивление вярно да съответства на свойствата на кожата.

▼B**Б. 40А. IN VITRO КОЖНА КОРОЗИЯ: ИЗПИТВАНЕ ВЪРХУ МОДЕЛ НА ЧОВЕШКА КОЖА****1. МЕТОД**

Този метод на изпитване е еквивалентен на OECD TG 431 (2004).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Кожната корозия се отнася до причиняването на необратими увреждания на тъканта на кожата вследствие прилагането на материал за изпитване (както се дефинира от Глобалната хармонизирана система за класификация и етикетирание на химични вещества и смеси (GHS) (1). Този метод на изпитване не изисква използването на живи животни или животински тъкани за оценката на корозивността на кожата.

Оценката на корозивността на кожата обикновено включва използването на лабораторни животни (2). Загрижеността за болката и страданието при прилагането на тази процедура е разгледана в ревизирия метод на изпитване Б.4, който позволява определянето на кожната корозия с помощта на алтернативни *in vitro* методи, с които се избягва болката и страданието на животните.

Първата стъпка към определянето на алтернативните тестове, които биха могли да се приложат за изпитване на кожната корозивност за регулаторни цели, беше да се проведат предварителни валидиращи изследвания (3). След това се направи официално проучване на методите *in vitro* за оценката на кожната корозия (4)(5) (6)(7)(8). Резултатът от тези изследвания и от други публикувана литература (9) доведе до препоръката да се използват следните изпитвания за оценката *in vitro* на кожната корозивност (10)(11)(12)(13): изпитването върху модел на човешка кожа (този метод) и транскутанното изпитване за електрическо съпротивление (виж метод на изпитване Б.40).

Валидиращите изследвания сочат, че изпитванията, включващи модели на човешка кожа (3)(4)(5)(9), са в състояние надеждно да разграничат между познати корозиви на кожата и некорозиви. Протокола от изпитването може да даде също индикация за разграничение между тежки и по-леки корозиви за кожата.

Изпитването, което се описва в този метод, позволява да се идентифицират корозивните химични вещества и смеси. Той позволява също и понататъшното идентифициране на некорозивните вещества и смеси, когато това се подкрепи от доказано определяне с помощта на съществуващата информация (например рН, структурно-активни връзки, човешки и/или животински данни) (1)(2)(13)(14). Изпитването обикновено не осигурява адекватна информация за кожните раздразнения, нито пък позволява подкатегоризацията на корозивните вещества, както е позволено в Глобалната хармонизирана система за класификация и етикетирание на химични вещества и смеси (GHS) (1).

За пълната оценка на локалните кожни ефекти след еднократно излагане на кожата се препоръчва да се спазва стратегията за последователно изпитване, която е приложена към тестови метод Б.4 (2) и която е описана в Глобалната хармонизирана система (GHS) (1). Тази стратегия на изпитване включва провеждането на *in vitro* тестове за кожна корозия (както са описани в този метод) и кожно раздразнение преди да се обсъжда изпитване при живи животни.

▼B

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Кожна корозия *in vitro*: е причиняването на необратимо увреждане на кожата, а именно видима некроза през епидермиса и вътре в дермиса, вследствие прилагането на изпитвано вещество за период до 4 часа. Типичните корозивни реакции са язви, кървене, кървящи струпеи, и до края на наблюдението, продължаващо 14 дни, обезцветяване поради избеляване на кожата, цели участъци с алопеция и белези. Хистопатологията трябва да се вземе под внимание при оценката на спорните лезии.

Клетъчна жизнеспособност: параметър, измерващ общата активност на клетъчната популация (например способността на клетъчната митохондриална дехидрогеназа да намалява жизнения оцветител МТТ), която, в зависимост от измерената крайна точка и използваната процедура на изпитване, корелира с общия брой и/или виталност на клетките.

1.3. РЕФЕРЕНТНИ ВЕЩЕСТВА

Таблица 1

Референтни химикали

Име	№ EINECS	№ CAS	
1,2-Диаминопропан	201-155-9	78-90-0	Силно корозивен
Акрилна киселина	201-177-9	79-10-7	Силно корозивен
2-терт. бутилфенол	201-807-2	88-18-6	Корозивен
Калиев хидроксид (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Корозивен
Сярна киселина (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Корозивен
Октанова киселина (каприлна киселина)	204-677-5	124-07-02	Корозивен
4-амино-1,2,4-триазол	209-533-5	584-13-4	Некорозивен
Еугенол	202-589-1	97-53-0	Некорозивен
Фенетил бромид	203-130-8	103-63-9	Некорозивен
Тетрахлоретилен	204-825-9	27-18-4	Некорозивен
Изостеаринова киселина	250-178-0	30399-84-9	Некорозивен
4-(метилдио)-бензалдехид	222-365-7	3446-89-7	Некорозивен

Повечето от изброените химикали са взети от списъка на химичните вещества, селектиран за международното валидиращо изследване на ECVAM (4). Изборът им се основава на следните критерии:

- i) равен брой корозивни и некорозивни вещества;
- ii) търговски налични вещества, обхващащи по-голямата част от съответните химични класове;
- iii) включване както на силно корозивни, така и на по-малко корозивни вещества, за да се постигне разграничаване, основаващо се на корозивна сила;

▼ B

- iv) избор на химични вещества, с които да може да се работи в лабораторни условия, без да има излагане на друг риск, освен корозивност.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

Методът на изпитване се прилага конкретно към триизмерния модел на човешка кожа, който се състои поне от реконструиран епидермис с функционален *stratum corneum*. Корозивните материали се идентифицират по способността им да предизвикват намаляване на клетъчната жизнеспособност (която се определя, например, като се прави изпитване за намаляване на МТТ (15) под определени прагови нива на определени периоди от време на въздействие. Принципът на изпитването на модела на човешка кожа се основава върху хипотезата, че корозивните химикали могат да проникнат в *stratum corneum* чрез дифузия или ерозия и са цитотоксични за лежащите отдолу слоеве клетки.

1.4.1. Процедура

1.4.1.1. Модели на човешка кожа

Моделите на човешка кожа могат да се създадат или закупят от търговски фирми (например моделите EpiDerm™ и EPISKIN™) (16)(17)(18)(19), или пък да бъдат разработени или конструирани в лабораторията за изпитване (20)(21). Признава се, че използването на човешка кожа е предмет на национални и международни етични съображения и условия. Всеки нов модел трябва да се валидира (поне до степеня, описана в 1.4.1.1.2). Моделите на човешка кожа, използвани при това изпитване трябва да отговарят на следното:

1.4.1.1.1. Общи условия за модела:

Да се използват човешки кератиноцити за конструирането на епитела. Трябва да са налични множество слоеве от жизнеспособни епителни клетки под функционалния *stratum corneum*. Кожният модел може да има също и стромален компонентен слой. *Stratum corneum* трябва да бъде многослоен с необходимия липиден профил, за да образува функционална бариера със здравина, за да може да устоява на бързото проникване на цитотоксични маркери. Свойствата на задържане на модела трябва да възпрепятстват преминаването на материала около *stratum corneum* към жизнената тъкан. Преминаването на изпитваните химични вещества около *stratum corneum* би довело до лошо моделиране на излагането на кожата. Моделът на кожа трябва да не е заразен с бактерии (включително микоплазма) и фунги.

1.4.1.1.2. Условия на функционалния модел:

Силата на жизнеспособност обикновено се измерва количествено с помощта на МТТ или други метаболитно преобразувани жизнени оцветители. В тези случаи оптичната плътност (OD), извлеченият (разредим) оцветител от отрицателната контролна тъкан трябва да бъде поне 20-кратно по-голяма от OD на извличащия разтворител (за преглед вижте (22)). Отрицателната контролна тъкан трябва да бъде стабилна в култура (да осигурява измервания с подобна надеждност) за цялата продължителност на периода на излагане по време на изпитването. *Stratum corneum* трябва да бъде достатъчно здрав, за да устои на бързото проникване на цитотоксични маркерни химикали (например 1 % Triton X-100). Това свойство може да се прецени чрез времето на излагане, което се изисква за намаляване на клетъчната жизнеспособност с 50 % (ET₅₀) (т.е. за моделите EpiDerm™ и EPISKIN™ то е > 2 часа). Тъканта трябва да показва възпроизводимост във времето и за предпочитане е и в различни лаборатории. Освен това тя трябва да може да предвижда корозивния потенциал на референтните вещества (вижте таблица 1), когато се използва в избрания протокол за изпитване.

▼B**1.4.1.2. Прилагане на изпитваните и контролните вещества**

Използват се два тъканни репликата за всяко обработване (време на излагане), включително и контроли. За течните материали трябва да се нанесе достатъчно изпитвано вещество, за да се разпредели равномерно по кожна повърхност: трябва да се използва минимум $25 \mu\text{L}/\text{cm}^2$. За твърдите материали, трябва да се нанесе достатъчно изпитвано вещество, което да покрие равномерно кожата, и то трябва да се овлажни с дейонизирана или дестилирана вода, за да направи добър контакт с кожата. Когато е необходимо, твърдите вещества трябва да бъдат смлени на прах преди използване. Методът на нанасяне трябва да бъде подходящ за изпитваното вещество (вижте справка 5). В края на периода на излагане изпитваният материал трябва внимателно да се измие от повърхността на кожата с подходящ буфер или 0,9 % NaCl.

За всяко проучване трябва едновременно да се използват положителни и отрицателни контроли, за да осигурят адекватни резултати на експерименталния модел. Препоръчваните вещества за положителни контроли са чиста оцетна киселина или 8N KOH. Препоръчваните вещества за отрицателни контроли са 0,9 % NaCl или вода.

1.4.1.3. Измервания на клетъчната жизнеспособност

За измерването на клетъчната жизнеспособност трябва да се използват само валидирани количествени методи. Освен това, измерването на жизнеспособността трябва да бъде съвместимо с използването на триизмерна тъканна конструкция. Фиксирането на неспецифичен оцветител не трябва да пречи на измерването на клетъчната жизнеспособност. Следователно, протеиносвързващи оцветители и онези, които не претърпяват метаболитно преобразуване (т.е. неутрално червено), не са подходящи. Най-често използваното изпитване е за намаляване на МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2у1)-2,5-дифенилтетразолиев бромид, Тиазолил син: номер EINECS 206-069-5, CA8-номер 298-93-1], което е доказало, че дава точни и възпроизводими резултати (5), но могат да се използват и други. Кожната проба се поставя в разтвор на МТТ със съответната концентрация (т.е. 0,3 — 1 mg/mL) при подходяща инкубационна температура за период от 3 часа. След това утаеният син продукт формазан се извлича с помощта на разтворител (изопропанол), а концентрацията на формазан се измерва, като се определили OD при дължина на вълната между 540 и 595 nm.

Химичното действие на изпитвания материал върху жизнения оцветител прилича това на клетъчния метаболизъм, което води до невярна оценка на жизнеспособността. Това се случва, когато такъв изпитван материал не се отстрани напълно от кожата чрез изплакване (9). Ако изпитваният материал действа пряко на жизнения оцветител, трябва да се използват допълнителни контроли, за да се открие и коригира влиянието на изпитваните вещества върху измерването на жизнеспособността (9)(23).

2. ДАННИ

За всяка тъкан в таблична форма трябва да се докладват стойностите на OD и изчисленият процент клетъчна жизнеспособност на изпитвания материал, положителните и отрицателни контроли, включително данните от повторните експерименти, там където са направени, както и средните и индивидуални стойности.

▼B**2.1. ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Получените стойности на OD за всяка изпитвана проба могат да се използват за изчисляването на процентната жизнеспособност в сравнение с отрицателната контрола, която произволно е определена на 100 %. Граничната процентна стойност на клетъчната жизнеспособност, разграничаваща корозивните от некорозивните изпитвани материали (или разграничаваща между различните корозивни класове), или статистически процедури, използвани при оценката на резултатите и идентифицирането на корозивните материали, трябва ясно да бъдат дефинирани и документирани, както и да бъде обосновано, че са подходящи. Общо взето, тези гранични стойности са установени по време на оптимизирането на изпитването, изпитване по време на предварителната валидация и потвърдени по време на валидиращото изследване. Един пример, предвиждането на корозивността, свързана с модела EpiDerm™ е (9):

Изпитваното вещество се счита за корозивно за човешката кожа:

- i) ако жизнеспособността му след 3 минути на излагане е по-малка от 50 %, или
- ii) ако жизнеспособността след 3 минути на излагане е по-голяма или равна на 50 %, а жизнеспособността след 1 час на излагане е по-малка от 15 %.

Изпитваното вещество се счита за некорозивно за човешката кожа:

- i) ако жизнеспособността след 3 минути на излагане е по-голяма или равна на 50 %, а жизнеспособността след 1 час на излагане е по-голяма или равна на 15 %.

3. ДОКЛАДВАНЕ**3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Протоколът от изпитването трябва да съдържа следната информация:

Изпитвано и контролно вещество:

- химично наименование (наименования) като по IUPAC или по CAS и CAS номер, ако е известен;
- чистота и състав на веществото или препаратата (в проценти от теглото);
- физико-химични свойства като физично състояние, рН, стабилност, разтворимост във вода, които имат отношение за провеждането на изследването;
- обработка на изпитваните/контролните вещества преди изпитването, ако има такава (като нагряване, смилане);
- стабилност, ако е известна.

Обосновка на използвания кожен модел и протокол.

Условия на изпитване:

- използвана клетъчна система;
- информация за калибрирането на уреда, използван за измерване на клетъчната жизнеспособност (например спектрофотометър);

▼B

- пълна придружаваща информация за конкретния използван модел на кожа, включително и валидността му;
- подробности за използваната процедура на изпитване;
- използвани дози на изпитване;
- описание на всякакви модификации на процедурата на изпитване;
- препратка към историческите данни за модела;
- описание на използваните критерии за оценка.

Резултати:

- таблично представяне на данните от индивидуалните проби на изпитване;
- описание на други наблюдавани ефекти.

Обсъждане на резултатите.

Заклучение.

4. ПРЕПРАТКИ

1. OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. [http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)6](http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6).
2. Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/Corrosion.
3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on in vitro skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23,219-255.
4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. In Vitro 12, 471—482.
5. Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhutter, H. G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. In Vitro 12, 483—524.
6. OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.
7. Balls, M., Blaauboer, B. J., Fentem, J. H., Bruner, L., Combes, R. D., Ekwall, B., Fielder, R. J., Guillouzo, A., Lewis, R. W., Lovell, D. P., Reinhardt, C. A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129—147.
8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf>.

▼B

9. Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C, Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J. P., Wiemann, C, Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H. G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. *ATLA* 28, pp.371—401.
10. ECVAM (1998). *ECVAM News & Views*. *ATLA* 26, 275—280.
11. ECVAM (2000). *ECVAM News & Views*. *ATLA* 28, 365—67.
12. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. [httpV/iccvam.niehs.nih.gov/methods/epidocs/epijsjDrd.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epidocs/epijsjDrd.pdf).
13. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st—2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat
14. Worth A. P., Fentem J. H., Balls M., Botham P. A., Curren R. D., Earl L. K., Esdaile D. J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* 26: 709—720.
15. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol. Meth.* 65, 55—63.
16. Cannon, C. L., Neal, P. J., Southee, J. A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. *Toxic. In Vitro* 8, 889—891.
17. Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. *International Journal of Pharmaceutics*. 203, 211—225.
18. Tinois E., Gaetani Q., Gayraud B., Dupont D., Rougier A., Pouradier D. X. (1994). The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis in vitro. In *In vitro Skin Toxicology*. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach: 133—140
19. Tinois E., Tiollier J., Gaucherand M., Dumas H., Tardy M., Thivolet J. (1991). In vitro and post - transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. *Experimental Cell Research* 193: 310—319
20. Parentau, N. L., Bilbo, P., Molte, C. J., Mason, V. S., and Rosenberg, H. (1992). The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. *Cytotechnology* 9, 163—171.
21. Wilkins, L. M., Watson, S. R., Prosky, S. J., Meunier, S. F., Parentau, N. L. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. *Biotechnology and Bioengineering* 43/8, 747—756.

▼B

22. Marshall, N. J., Goodwin, C. J., Holt, S. J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regulation* 5, 69—84.
23. Fentem, J. H., Briggs, D., Chesne', C, Elliot, G. R., Harbell, J. W., Heylings, J. R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J. J. M., and Botham, P. A. (2001). A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. *Toxic. In Vitro* 15, 57—93.

▼B**Б.41. IN VITRO 3Т3 NRU ИЗПИТВАНЕ ЗА ФОТОТОКСИЧНОСТ****1. МЕТОД**

Този метод е еквивалентен на OECD TG 432 (2004).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Фототоксичността се определя като токсичната реакция от приложено върху тялото вещество, която се проявява или увеличава (и е забележима при ниски дози) след последващо излагане на светлина или се предизвиква от облъчване на кожата след систематично прилагане на дадено вещество.

Изпитването за фототоксичност *in vitro* 3Т3 NRU се използва за идентифициране на фототоксичния потенциал на изпитваното вещество, индуциран от веществото, активирано след излагане на светлина. Изпитването прави оценка на фотоцитотоксичността, като сравнява намаляването на жизнеспособността на клетките, изложени на веществото в присъствие и отсъствие на светлина. Веществата, които се идентифицират с помощта на настоящото изпитване, има вероятност да са фототоксични *in vivo* вследствие на систематично прилагане и разпределение по кожата или след локално приложение.

Известно е, че много видове химични вещества предизвикват фототоксични ефекти (1)(2)(3)(4). Общият признак между тях е способността им да абсорбират светлинна енергия в границите на спектъра на слънчевата светлина. Според първия закон на фотохимията (Закон на Grothaus-Draper), фотореакцията изисква достатъчна абсорбция на светлинни кванти. По този начин, преди да се предприеме биологично изпитване, следва да се определи абсорбционният спектър UV/vis на изпитваното вещество според насоките за изпитване на OECD 101. Предполага се, че ако коефициентът на моларно поглъщане/абсорбция е по-нисък от $10 \text{ литра} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, не е вероятно химичното вещество да е фотореактивно. Такова вещество не е необходимо да се изпитва с *in vitro* 3Т3 NRU за фототоксичност или с други биологични изпитвания за неблагоприятни фотохимични реакции (1)(5). Вж. също приложение 1.

Надеждността и приложимостта на изпитването *in vitro* 3Т3 NRU за фототоксичност бяха наскоро оценени (6)(7)(8) (9). Изпитването *in vitro* 3Т3 NRU за фототоксичност показва, че с него може да се предвижда остра фототоксичност при животни и хора *in vivo*. Той не е замислен да предвижда други неблагоприятни ефекти, които могат да се породят от комбинираното действие на веществото и светлината, напр. той не се отнася за фотогенотоксичност, фотоалергии или фотоканцерогенност, нито пък позволява да се направи оценка на фототоксичната сила. Освен това изпитването не е проектирано да се занимава с индиректните механизми на фототоксичността, ефектите от метаболитите на изпитваното вещество или ефектите от смесите.

Докато използването на метаболизиращи системи е общо изискване за всички изпитвания *in vitro* за предвиждане на генотоксичен и канцерогенен потенциал, досега във фототоксикологията съществуват много редки примери, в които е необходима метаболитна трансформация, за да може определено вещество да действа като фототоксин *in vivo* или *in vitro*. Поради това се счита, че нито е необходимо, нито е научно оправдано настоящото изпитване да се провежда при система на метаболитно активиране.

▼B

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Облъчване: интензитет на ултравиолетовата (UV) или видимата светлина, която попада върху дадена повърхност, измерен в W/m^2 или mW/cm^2 .

Светлинна доза: количество (=интензитет × време) на ултравиолетовото (UV) или видимото лъчение, което попада върху дадена повърхност, изразено в джаули (= $W \times s$) на повърхностна площ, напр. J/m^2 или J/cm^2 .

Диапазони на UV светлината: препоръчаните от CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) обозначения са UVA (315—400 nm), UVB (280—315 nm) и UVC (100—280 nm). Използват се и други обозначения; границата между UVB и UVA често се поставя на 320 nm, а UVA може да се раздели на UV-A1 и UV-A2, като границата се поставя на около 340 nm.

Клетъчна жизнеспособност: параметър, измерващ общата активност на клетъчната популация (напр. поглъщането на жизнения оцветител неутрално червено в клетъчните лизозоми), който в зависимост от измерваната крайна точка и използваната процедура на изпитване корелира с общия брой и/или жизнеността на клетките.

Относителна клетъчна жизнеспособност: клетъчната жизнеспособност, изразена спрямо разтворител (отрицателни) контроли, взети по време на пълната процедура на изпитване (+Irr или -Irr), но нетретирани с веществото на изпитване.

PIF (Photo-Irritation-Factor — фактор на фотодразнене): фактор, получен при сравняването на две еднакво ефективни цитотоксични концентрации (IC_{50}) от изпитваното вещество, получен в отсъствието (-Irr) или присъствието (+Irr) на нецитотоксично облъчване с UVA/vis светлина.

IC_{50} : концентрацията на изпитваното вещество, при която клетъчната жизнеспособност намалява с 50 %.

MPE (среден фотоефект): измерване, получено с помощта на математически анализ на кривите на реакция на концентрация, получени в отсъствието (-Irr) или присъствието (+Irr) на нетоксично облъчване с UVA/vis светлина.

Фототоксичност: остра токсична реакция, която се предизвиква след първото излагане на кожата на определени химични вещества и последващо излагане на светлина или предизвикана по подобен начин от облъчване на кожата след систематично прилагане на химично вещество.

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

Изпитването *in vitro* 3T3 NRU за фототоксичност се основава на сравняването на цитотоксичността на едно вещество, когато се изпитва в присъствието или отсъствието на излагане на цитотоксична доза симулирана слънчева светлина. Цитотоксичността в това изпитване се изразява като намаляване, зависещо от концентрацията, на поглъщането на жизнения оцветител неутрално червено (НЧ), когато се измерва 24 часа след третирането с изпитваното вещество и облъчване (10). НЧ е слаб катионен оцветител, който лесно прониква през клетъчната мембрана чрез недифузия, като се акумулира вътрешноклетъчно в лизозомите. Промените по повърхността на чувствителната лизозомна мембрана водят до лизозомна крехкост и други промени, които постепенно стават необратими. Подобни промени, предизвикани от действието на ксенобиотици, водят до намалено поглъщане и свързване на НЧ. По този начин е възможно да се направи разграничение между жизнеспособни, увредени и мъртви клетки, което е смисълът на настоящото изпитване.

▼B

Balb/c 3T3 клетките се поддържат в култура в продължение на 24 часа, за да се образуват монослоеви. По две 96-гнездни плочки на изпитвано вещество предварително са инкубирани с осем различни концентрации на изпитваното вещество за период от 1 час. След това една от тези две плочки се излага на най-високата доза цитоксично облъчване, докато другата плочка се съхранява на тъмно. После в двете плочки средата на третиране се сменя с културна среда и след още 24 часа инкубиране клетъчната жизнеспособност се определя чрез поглъщането на НЧ. Клетъчната жизнеспособност се изразява като процент от нетретираните контроли от разтворители и се изчислява за всяка концентрация на изпитване. За да се предскаже цитотоксичният потенциал, се сравняват получените реакции на концентрация в присъствието или отсъствието на облъчване, обикновено на ниво IC_{50} , т.е. концентрация, намаляваща клетъчната жизнеспособност с 50 % в сравнение с нетретираните контроли.

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

1.4.1. Подготовка

1.4.1.1. Клетки

За валидиращото проучване са използвани постоянна линия от фибробластни клетки на мишки, Balb/c 3T3, клон 31, или от Американската банка за типови култури (ATCC), Манасас, Вирджиния, САЩ, или от Европейската банка на клетъчни култури (ECACC), Салисбъри, Уилтшир, Обединеното кралство, и затова се препоръчва клетъчните култури да се получават от добре квалифицирани клетъчни банки. Други клетки или клетъчни линии могат да се използват за същата процедура на изпитване, ако условията на отглеждане на културите са адаптирани към специфичните нужди на клетките, но еквивалентността следва да се докаже.

Клетките следва да се проверяват редовно за отсъствие на микоплазмено заразяване и да се използват само ако не се открива такова (11).

Важно е UV чувствителността на клетките да се проверява редовно съгласно качествения контрол, описан в настоящия метод. Тъй като UV чувствителността на клетките може да се увеличи с броя на преминаванията, следва да се използват Balb/c 3T3 клетки с най-нисък брой на преминавания, който може да се получи, за предпочитане по-нисък от 100 (Вж. точка 1.4.2.2.2 и приложение 2).

1.4.1.2. Условия за средата и отглеждането на културите

Следва да бъдат осигурени подходящи условия за средата и инкубация за рутинното преминаване на клетки и по време на процедурата на изпитване, напр. за Balb/c 3T3 това са DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), в съчетание с 10 % серум от новородено теле, 4 mM глутамин, пеницилин (100 IU) и стрептомицин (100 µg/ml), както и влажна инкубация при 37 °C, 5 — 7,5 % CO₂ в зависимост от буфера (вж. точка 1.4.1.4, втори параграф). Особено важно е условията за отглеждане на клетъчните култури да осигуряват време за клетъчния цикъл в нормалния исторически обхват на използваните клетки и клетъчни линии.

1.4.1.3. Изготвяне на културите

Клетките от замразения запас от култури се посяват в хранителна среда с подходяща плътност и се субкултивират поне веднъж, преди да бъдат използвани при изпитването *in vitro* 3T3 NRU за фототоксичност.

▼ B

Клетките, използвани за изпитването за фототоксичност, се посяват в хранителна среда с подходяща плътност, така че културите да не достигат сливане до края на изпитването, т.е. когато клетъчната жизнеспособност се определя 48 часа след посяването на клетките. За клетките Balb/c 3T3, отгледани в 96-гнездни плочки, препоръчителната гъстота на клетките е 1×10^4 клетки на гнездо.

За всяко изпитвано вещество клетките се посяват еднакво в две отделни 96-гнездни плочки, които преминават едновременно през паялата процедура на изпитване при еднакви условия за културите, с изключение на периода време, през който едната от плочките се подлага на облъчване (+Irr), а другата се съхранява на тъмно (-Irr).

1.4.1.4. *Подготовка на изпитваното вещество*

Изпитваните вещества следва да са прясно приготвени непосредствено преди употреба, освен ако няма данни, които доказват тяхната стабилност при съхранение. Препоръчва се боравенето с веществото и първоначалната обработка на клетките да се извършват изцяло при светлинни условия, при които да се избегне фотоактивирането или разрушаването на изпитваното вещество преди облъчването.

Изпитваните вещества могат да се разтворят в буферни солни разтвори, например балансирания солен разтвор на Ърл (Earl's Balanced Salt Solution — EBSS) или други физиологично балансиран буферни разтвори, които да са свободни от протеинови компоненти, светлинно поглъщащи компоненти (като например цветни рН-индикатори и витамини), за да се избегне интерференцията по време на облъчването. Тъй като по време на облъчване клетките се държат около 50 минути извън CO₂ инкубатора, следва да се вземат мерки да се избегне алкализирването. Ако се използват слаби буфери като EBSS, това може да се постигне чрез инкубиране на клетките при 7,5 % CO₂. Ако клетките се инкубират при 5 % CO₂, следва да се избере по-силен буфер.

Изпитваните химични вещества с ограничена водоразтворимост следва да се разтворят в подходящ разтворител. Ако се използва разтворител, той следва да присъства в постоянен обем във всички култури, т.е. в отрицателните (разтворител) контроли, както и във всички концентрации на изпитваното вещество, и да бъде нетоксичен за тази концентрация. Концентрациите на изпитваните вещества следва да се избират така, че да се избягва образуването на утайки или мътни разтвори.

За разтворители се препоръчват диметилсулфоксид (DMSO) и етанол (ЕТОН). Други разтворители с ниска токсичност също могат да бъдат подходящи. Преди употреба следва да се направи оценка на всички разтворители по отношение на техните специфични свойства, напр. реагиране с изпитваното вещество, потискане на фототоксичния ефект, свойства за отстраняване на примеси чрез свързването им с радикали и/или химическа стабилност в разтворителя.

Центробежно смесване и/или разбъркване с ултразвук, и/или загряване до подходяща температура също могат да бъдат използвани, за да се подпомогне разтворимостта, освен ако това не влияе върху стабилността на изпитваното вещество.

▼B

1.4.1.5. Условия на облъчване

1.4.1.5.1. Светлинен източник

Изборът на подходящ източник на светлина и на филтри е решаващ фактор при изпитването за фототоксичност. Светлината в UVA диапазона и видимата област обикновено се свързва с фототоксичните реакции *in vivo* (3)(12), докато, общо взето, UVB е с по-малко значение, но е високо цитотоксична; цитотоксичността се увеличава 1 000-кратно при промяна на дължината на вълната от 313 nm на 280 nm (13). Критериите за избор на подходящ светлинен източник следва да включват изискването светлинният източник да излъчва в дължини на вълните, които се поглъщат от изпитваното вещество (спектр на абсорбция), и светлинната доза (достижима в приемливо време на излагане) следва да бъде достатъчна за откриването на познати фототоксични химични вещества. Освен това използваните дължини на вълните и дози следва да не бъдат ненужно вредни за системата на изпитване, напр. излъчване на топлина (инфрачервен диапазон).

Симулирането на слънчева светлина със слънчеви симулатори се смята за оптималния изкуствен светлинен източник. Разпределението на силата на облъчване от филтрирания слънчев симулатор следва да бъде близко до това на излъчването на дневна светлина на открито, посочено в (14). Като слънчеви симулатори се използват както ксенонова дъга, така и (подобрени) живачно-метал халогенни дъги (15). Последните имат предимството да излъчват по-малко топлина и да са по-евтини, но по-малко наподобяват слънчевата светлина, отколкото ксеноновите дъги. Тъй като всички слънчеви симулатори излъчват значителни количества UVB, те следва да бъдат подходящо филтрирани, за да се намали присъствието на високотоксичните UVB дължини. Понеже пластмасовите материали за клетъчни култури съдържат UV стабилизатори, спектърът следва да се измерва през същия тип капак на 96-гнездната плочка, който ще се използва при изпитването. Независимо от мерките, предприети за смекчаване на части от спектъра чрез филтриране, или от неизбежните филтърни ефекти на оборудването, спектърът, записан след тези филтри, не бива да се отклонява от стандартната дневна светлина (14). Пример за спектралното разпределение на облъчването от филтрирания слънчев симулатор, използвано при валидиращото изпитване на изпитването *in vitro* 3T3 NRU за фототоксичност, е даден в (8)(16). Вж. също приложение 2, фигура 1.

1.4.1.5.2. Дозиметрия

Интензитетът на светлината (облъчването) следва да се проверява редовно преди всяко изпитване за фототоксичност, като се използва подходящ ширококолов UV-метър. Интензитетът следва да се измерва през същия тип капак на 96-гнездната плочка, който ще се използва при изпитването. UV-метърът следва да бъде калибриран според източника. Показателите на UV-метъра следва да се проверят и за тази цел се препоръчва използването на втори референтен UV-метър от същия вид и със същото калибриране. В идеалния случай на по-големи интервали следва да се използва спектрорадиометър за измерване на спектралното облъчване от филтрирания светлинен източник и за проверка на калибрирането на ширококоловия UV-метър.

Дозата от 5 J/cm^2 (както е измерена в UVA диапазона) е определена за нетоксична за 10^5 3T3 клетки и за достатъчно силна, за да възбуди химичните вещества да предизвикат фототоксични реакции (6) (17), напр. за да се постигнат 5 J/cm^2 в период от време 50 минути, облъчването е настроено на $1,7 \text{ mW/cm}^2$. Вижте приложение 2, фигура 2. Ако се използва друга клетъчна линия или светлинен източник, дозата на облъчване може да се наложи да се калибрира, така че да може да се избере такъв режим на дозиране, който да не е вреден за клетките, но да е достатъчен, за да възбуди стандартните фототоксини. Времето за излагане на светлина се изчислява по следния начин:



$$t(\text{min}) = \frac{\text{доза на облъчване (J/cm}^2) \times 1000}{\text{облъчване (mW/cm}^2) \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ Wsec})$$

1.4.2. Условия на изпитване

1.4.2.1. Концентрации на изпитваните вещества

Обхватите на концентрациите на веществата, изпитвани в присъствието (+Irr) или отсъствието (-Irr) на светлина, следва да бъдат адекватно определени чрез провеждането на опити за определяне на обхвата на дозите. Може да е полезно да се направи оценка на разтворимостта в началото и на 60-ата минута (или каквото време за третиране се използва), тъй като разтворимостта може да се промени с течение на времето или по време на излагането. За да се избегне токсичност, предизвикана от неправилни условия на културата или от високо киселинни или алкални химични вещества, рН на клетъчните култури с добавеното изпитвано вещество следва да бъде в обхвата 6,5—7,8.

Най-високата концентрация на изпитваното вещество следва да бъде в границите на условията за физиологично изпитване, напр. осмотичният и рН стресът следва да се избегнат. В зависимост от изпитваното вещество може да се наложи да се вземат под внимание други физикохимични свойства като фактори, ограничаващи най-високата концентрация на изпитване. Сравнително неразтворимите вещества, които не са токсични при концентрации до точката на насищане, следва да се изпитат на най-високата достижима концентрация. Като цяло, утаяване на изпитваното вещество при която и да е от концентрациите на изпитване следва да се избягва. Максималната концентрация на изпитваното вещество не бива да превишава 1000 µg/ml; осмоларността не следва да превишава 10 mOsmol/l. Следва да се използва разреждане в геометрична прогресия на 8 концентрации на изпитваното вещество с постоянен коефициент (вж. точка 2.1, втори параграф).

Ако съществува информация (от експериментите за определяне на обхвата), че изпитваното вещество не е цитотоксично до граничната концентрация при опита на тъмно (-Irr), но е високотоксично, когато е облъчено (+Irr), обхватите на концентрации, които следва да се изберат за опита (+Irr), могат да се различават от тези, които се избират за опита (-Irr), за да се изпълни изискването за адекватно качество на данните.

1.4.2.2. Контроли

1.4.2.2.1. Чувствителност на клетките на облъчване, установяване на исторически данни:

Клетките следва да се проверяват редовно (приблизително на всяко пето преминаване) за чувствителност спрямо светлинния източник, като се прави оценка на тяхната жизнеспособност след излагането им на увеличаващи се дози облъчване. Няколко дози облъчване, включително на нива, значително по-високи от тези, използвани при изпитването 3T3 NRU за фоточувствителност, следва да се използват при тази оценка. Тези дози се измерват най-лесно количествено чрез измерване на частта UV на светлинния източник. Клетките се посяват при гъстотата, използвана при изпитването *in vitro* 3T3 NRU за фоточувствителност, и се облъчват на другия ден. После, един ден по-късно, се определя клетъчната жизнест, като се използва поглъщането на неутрално червено. Следва да се покаже, че получената най-висока нетоксична доза (напр. при валидиращото изследване: 5 J/cm² [UVA]) е била достатъчна да се класифицират правилно референтните вещества (таблица 1).

▼B

1.4.2.2.2. Чувствителност на облъчване, проверка на настоящото изпитване:

Изпитването отговаря на критериите за качество, ако облъчените отрицателни/разтворител контроли показват жизнеспособност над 80 % в сравнение с необлъчените.

1.4.2.2.3. Жизнеспособност на разтворителите контроли:

Абсолютната оптична плътност ($OD_{540 \text{ NRU}}$) на неутралното червено, извлечено от разтворителите контроли, показва дали 1×10^4 клетки, посети на гнездо, са се увеличили с нормално време на делене през двата дни на изпитването. Изпитването отговаря на критериите за приемане, ако средната $OD_{540 \text{ NRU}}$ на нетретираните контроли е $\geq 0,4$ (т.е. приблизително двадесет пъти фоновата абсорбция от разтворителя).

1.4.2.2.4. Положителни контроли

Познати фототоксични вещества се изпитват едновременно всеки с изпитване *in vitro* 3T3 NRU за фототоксичност. Препоръчва се хлорпромазин (CPZ). За да се изпита CPZ по стандартния протокол за изпитване *in vitro* 3T3 NRU за фототоксичност, са определени следните критерии за приемане: CPZ облъчен (+Irr): $IC_{50} = 0,1$ до $2,0 \mu\text{g/ml}$, CPZ необлъчен (-Irr): $IC_{50} = 7,0$ до $90,0 \mu\text{g/ml}$. Факторът на фотодразнене (PIF) следва да бъде > 6 . Следва да се наблюдават историческите показатели на положителната контрола.

Други фототоксични вещества, подходящи за химичния клас или характеристиките на разтворимост на веществото, на което се прави оценка, могат също да бъдат използвани като паралелни положителни контроли вместо хлорпромазина.

1.4.3. Процедура на изпитване (6)(7)(8)(16)(17):

1.4.3.1. Първи ден:

Отмерете по $100 \mu\text{l}$ хранителна среда в периферните гнезда на 96-гнездната микротитърна плочка за тъканни култури (= празни). В останалите гнезда отмерете по $100 \mu\text{l}$ от клетъчна суспензия от 1×10^5 клетки/ml в хранителна среда (= 1×10^4 клетки/гнездо). Следва да се подготвят по две плочки за всяка от сериите концентрации на изпитваното вещество, както и за контролата разтворител и положителната контрола.

Клетките се инкубират в продължение на 24 часа (вж. точка 1.4.1.2), докато образуват полуслат монослой. Този инкубационен период позволява възстановяване на клетките, прикрепване и експоненциален растеж.

1.4.3.2. Втори ден:

След инкубацията отдекантирайте хранителната среда от клетките и измийте внимателно със $150 \mu\text{l}$ от буферния разтвор, използван за инкубацията. Добавете $100 \mu\text{l}$ от буфера, съдържащ необходимата концентрация от изпитваното вещество или разтворител (разтворител контрола). Приложете 8 различни концентрации на изпитваното вещество. Инкубирайте клетките с изпитваното вещество на тъмно в продължение на 60 минути (вж. също точка 1.4.1.2 и точка 1.4.1.4, втори параграф).

От двете плочки, приготвени за всяка серия от концентрации на изпитваното вещество и контролите, изберете една, обикновено случайно, за определяне на цитотоксичността (-Irr) (т.е. контролната плочка) и една (третираната плочка) — за определяне на фототоксичността (+Irr).

▼B

За да направите +Igг излагане, облъчете клетките при стайна температура за период от 50 минути през капака на 96-гнездната плочка с най-високата доза облъчване, която е нетоксична (вж. също приложение 2). Поставете необлъчените плочки при стайна температура в тъмна кутия в продължение на 50 минути (= времето за излагане на светлина).

Отдекантирайте изпитвания разтвор и внимателно измийте два пъти с 150 µl от буферния разтвор, използван за инкубация, който обаче не съдържа от изпитвания материал. Сменете буфера с хранителна среда и инкубирайте (виж точка 1.4.1.2) до другия ден (18—22 часа).

1.4.3.3 *Трети ден:*

1.4.3.3.1 **Микроскопска оценка**

Клетките трябва да се изследват за растеж, морфология и цялост на монослоя с помощта на микроскоп фазов контраст. Трябва да се водят бележки за клетъчната морфология и въздействието върху клетъчния растеж.

1.4.3.3.2 **Изпитване за поглъщане на Неутрално червено**

Измийте клетките със 150 µl от предварително затоплен буфер. Отстранете измиващия разтвор с леко потупване. Добавете 100 µl от 50 µg/mL Неутрално червено (NR) (3-амин-7-диметиламино-2-метилфеназин хидрохлорид, номер EINECS 209-035-8; CAS номер 553-24-2; С.І. 50040) в среда без серум (16) и инкубирайте, както е описано в параграф 1.4.1.2., в продължение на 3 часа. След инкубацията отстранете средата от NR и измийте клетките със 150 µl от буфера. Отдекантирайте и отстранете останалия буфер чрез попиване или центрофугиране.

Добавете точно 150 µl дезорбция за разтвор на НЧ (пряно приготвен от 49 части вода + 50 части етанол + 1 част оцетна киселина).

Разклатете леко микротитърната плочка на шейкър за микротитърни плочки за около 10 минути, докато НЧ не се извлече от клетките и не образува хомогенен разтвор.

Измерете оптичната плътност на екстракта НЧ при 540 nm в спектрофотометъра, като използвате празните места за референтни. Запишете данните във формата на електронен файл за последващ анализ.

2. **ДАННИ**

2.1. **КОЛИЧЕСТВО И КАЧЕСТВО НА ДАННИТЕ**

Данните от изпитването трябва да позволяват значим анализ на реакцията на концентрация, получена при наличието или отсъствието на облъчване и ако е възможно, концентрацията на изпитваното вещество, при която се намалява клетъчната жизнеспособност до 50 % (IC₅₀). Ако се открие цитотоксичност, трябва така да се определят обхватът на концентрациите и интервала между отделните концентрации, за да може кривата добре да опише експерименталните данни.

Както за чисто положителните, така и за чисто отрицателните резултати (виж точка 2.3, първия параграф), първоначалният експеримент, подкрепен от един или повече предварителни експеримента за определяне на обхвата, може да бъде достатъчен.

▼B

Двусмислените, гранични или неясни резултати трябва да се изяснят чрез допълнителни изпитвания (виж също точка 2.4, втори параграф). В такива случаи трябва да се обмисли промяна на експерименталните условия. Експериментални условия, които могат да се променят, включват обхвата на концентрациите или интервала, времето преди инкубацията и времето за излагане на облъчване. За веществата, неустойчиви във вода, може да бъде подходящо по-кратко време на излагане.

2.2. ОЦЕНКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

За да могат резултатите да се оценят, може да се изчислят фактора на фотодразнене (PIF) или средния фотоефект (MPE).

За изчисляване на мерките фототоксичност (виж по-долу), наборът от дискретни стойности на реакция на концентрация трябва да се опише от подходяща крива на непрекъснати стойности на реакция на концентрация (модел). Налагането на кривата върху данните обикновено се прави с помощта на нелинеен регресивен метод (18). За да се оцени влиянието на променливостта на данните върху описващата крива, се препоръчва да се използва процедура bootstrap.

Факторът на фотодразнене (PIF) се изчислява по следната формула:

$$\text{PIF} = \frac{\text{IC}_{50}(-\text{Irr})}{\text{IC}_{50}(+\text{Irr})}$$

Ако IC₅₀ в присъствието или отсъствието на светлина не може да се изчисли, то PIF не може да се определи за изпитвания материал. Средният фотоефект (MPE) се основава на сравняването на пълните криви на реакция на концентрация (19). Той се определя като среднотежестна стойност на представителен набор от стойности на фотоефекта

$$\text{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i \text{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

Фотоефектът PE_C, за която и да било концентрация C, е произведението от ефекта на реакция RE_C и ефекта на дозата DE_C т.е. PE_C = RE_C x DE_C. Ефектът на реакция RE_C представлява разликата от реакциите, наблюдавани в присъствието и отсъствието на светлина, т.е. RE_C = R_c (-Irr) – R_c (+Irr). Ефектът на дозата се определя с:

$$\text{DE}_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

където C* представлява еквивалентната концентрация, т.е. концентрацията, при която реакцията при +Irr се изравнява с реакцията при -Irr при концентрация C. Ако C* не може да се определи, понеже стойностите на реакция от кривата +Irr систематично са по-високи или по-ниски от R_c(-Irr), ефектът на дозата се взема като 1. Тегловните коефициенти w_i представляват най-голямата стойност на реакция, т.е. w_i = MAX {R_i (+Irr), R_i (-Irr)}. Решетката на концентрациите C_i се избира така, че един и същи брой точки да попадат във всеки един от интервалите на концентрация, получени от стойностите на концентрацията в експеримента. Изчисляването на MPE се ограничава до максималната стойност на концентрацията, при която поне едната от двете криви все още съдържа стойност на реакция от поне 10 %. Ако тази максимална концентрация е по-висока от концентрацията, използвана в експеримента +Irr, остатъчната част от кривата +Irr се взема като стойност на реакцията „0“. В зависимост от това дали стойността MPE е по-голяма от правилно избрана прагова стойност, (MPE_c = 0,15) или не, химичното вещество се класифицира като фототоксично.

▼B

Съществува софтуерен пакет за изчисляване на PIF и MPE от (20).

2.3. ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Въз основа на валидиращото изследване (8), изпитвано вещество с PIF < 2 или MPE < 0,1 се очаква да е с: „отсъствие на фототоксичност“. При PIF > 2 и < 5 или MPE > 0,1 и < 0,15 очаква да е с: „вероятна фототоксичност“; а при PIF > 5 или MPE > 0,15 се очаква да е с: „фототоксичност“.

За всяка лаборатория, която за първи път провежда това изпитване, референтните материали, изброени в таблица 1, трябва да бъдат предварително изпитани, преди да се предприеме изпитване на веществата на изпитване за оценка на фототоксичността. Стойностите PIF или MPE трябва да са близки до тези, споменати в таблица 1.

Таблица 1

Химично наименование	№ EINECS	№ CAS	PIF	MPE	Абсорбция Върх	Разтворител (1)
Амиодарон HCL	243-293-2	[19774-82-4]	>3,25	0,27—0,54	242 nm 300 nm (рамо)	етанол
Хлоро-промазин HCL	200-701-3	[69-09-0]	>14,4	0,33—0,63	309 nm	етанол
Норфлоксацин	274-614-4	[70458-96-7]	>71,6	0,34—0,90	316 nm	ацетонитрил
Антрацен	204-371-1	[120-12-7]	>18,5	0,19—0,81	356 nm	ацетонитрил
Протопорфирин IX, Динатрий	256-815-9	[50865-01-5]	>45,3	0,54—0,74	402 nm	етанол
L-Хистидин		[7006-35-1]	№ PIF	0,05—0,10	211 nm	вода
Хексахлорофен	200-733-8	[70-30-4]	1,1 - 1,7	0,00—0,05	299 nm 317 nm (рамо)	етанол
Натриев лаурил сулфат	205-788-1	[151-21-3]	1,0 - 1,9	0,00—0,05	няма абсорбция	вода

(1) Разтворител, използван за измерване на абсорбцията.

2.4. ТЪЛКУВАНЕ НА ДАНИТЕ

Ако фототоксичните ефекти се наблюдават само при най-високата концентрация на изпитване (особено при водоразтворимите изпитвани вещества), може да се наложи разглеждане на допълнителни фактори за оценка на риска. Те могат да включват данни за кожната абсорбция и акумулирането на веществото в кожата и/или данни от други изпитвания, напр. изпитването на веществото *in vitro* върху животинска или човешка кожа или върху модели на кожа.

▼B

Ако не се проявява никаква токсичност (+I_g и -I_g) и ако малката разтворимост е ограничила концентрациите, които могат да се изпитат, може да се постави под съмнение съвместимостта на изпитваното вещество с това изпитване и да трябва да се проведе потвърдително изпитване, напр. с друг модел.

4. **ДОКЛАДВАНЕ****ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Протоколът от изпитването трябва да включва поне следната информация:

Изпитвано вещество:

- идентификационни данни, приети генерични наименования и номер по ICAS и CAS номер, ако са известни;
- физическа природа и чистота;
- физикохимични свойства с отношение към провеждане изследването;
- абсорбционен спектър на UV/vis;
- стабилност и фотостабилност, ако са известни.

Разтворител:

- обосновка на избора на разтворител;
- разтворимост на изпитваното вещество в разтворителя;
- процентно съдържание на разтворителя в средата на третиране.

Клетки:

- тип и източник на клетките;
- липса на микоплазма;
- брой на преминаващите клетки, ако е известен;
- чувствителност на клетките на облъчване, определена с апаратурата за облъчване, използвана при изпитването *in vitro* 3T3 NRU за фототоксичност.

Условия на изпитване (1); *инкубиране преди и след третиране*:

- тип и състав на хранителната среда;
- инкубационни условия (концентрация на CO₂; температура; влажност);
- продължителност на инкубацията (предварително и последващо обработване).

Условия на изпитване (2); *третиране с веществото*:

- обяснение за реда на избор на концентрациите на изпитваното вещество при присъствието и отсъствието на облъчване;
- в случай на ограничена разтворимост на изпитваното вещество и отсъствие на цитотоксичност: обяснение на реда за изпитване на най-висока концентрация;
- тип и състав на средата на третиране (буферен солен разтвор);
- продължителност на химичното третиране.

Условия на изпитване (3); *облъчване*:

- описание на реда за избор на използвания източник на светлина;

▼B

- производител и тип на светлинния източник и на радиометъра;
- характеристики на спектралното облъчване от светлинния източник;
- характеристики на пропускане и поглъщане на използвания филтър(ри);
- характеристики на радиометъра и подробности за калибрирането му;
- разстояние между светлинния източник и системата за изпитване;
- UVA облъчване на това разстояние, изразено в mW/cm^2 ;
- продължителност на излагането на UV/vis светлина;
- UVA доза (облъчване \times време), изразена в J/cm^2 ;
- температура на клетъчните култури по време на облъчване и клетъчните култури, съхранявани в това време на тъмно.

Условия на изпитване (4); *изпитване за жизнеспособност с Неутрално червено*:

- състав на средата за третиране с Неутрално червено;
- продължителност на инкубацията при Неутрално червено;
- инкубационни условия (концентрация на CO_2 ; температура; влажност);
- условия за екстракция на Неутрално червено (агент на екстракцията, продължителност);
- дължина на вълната, използвана за спектрометричното отчитане за оптичната плътност на Неутралното червено;
- втора дължина на вълната (за сравнение), ако е използвана;
- съдържание на пробата използвана за „празно“ измерване със спектрофотометъра, ако е използвана такава.

Резултати:

- клетъчната жизнеспособност, получена при всяка концентрация на изпитваното вещество, изразена в процент жизнеспособност от средната едновременна жизнеспособност на контролите разтворител;
- кривите на реакция на концентрация (химична концентрация на изпитване спрямо сравнителна клетъчна жизнеспособност), получени при едновременни +Irg и -Irg експерименти;
- анализ на кривите на реакция на концентрация: ако е възможно, изчисляване/пресмятане на IC_{50} (+Irg) и IC_{50} (-Irg);
- сравнение на двете криви на реакция на концентрация, получени в присъствието или отсъствието на облъчване, или чрез калкулиране на фактора на фото дразнене (PIF), или чрез изчисляване на средния фотоефект (MPE);
- критерии за приемане на изпитването; едновременен контрол с разтворител;
- абсолютна жизнеспособност (оптична плътност екстракта на Неутрално червено) на облъчените или необлъчени клетки;
- исторически отрицателни данни и данни за разтворителя контрола; средни и стандартни отклонения;
- критерии за приемане на изпитването; едновременен положителен контрол;

▼B

— IC₅₀(+Irr) и IC₅₀(-Irr) и PIFMPE на веществото положителна контрола;

— исторически данни за веществото положителна контрола: IC₅₀(+Irr) и IC₅₀(-Irr) и PIFMPE; средни и стандартни отклонения.

Обсъждане на резултатите на резултатите.

Заклучения.

4.

ПРЕПРАТКИ

1. Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. *Toxic. In Vitro* 7: 95—102.
2. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In „Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry“ Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI—XXXV.
3. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. *ATLA*, 22, 314—348.
4. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In „The science of Photobiology“ Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79—110.
5. OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 „Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water“ Environment Directorate, OECD, Paris.
6. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F. Moore, L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxic. In Vitro* 8, 793—796.
7. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, *ATLA*, 26, 7—8.
8. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxic. In Vitro* 12, 305—327.
9. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.
10. Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Lett.*, 24, 119—124.
11. Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. *Analytical Biochemistry* 171, 225—237.

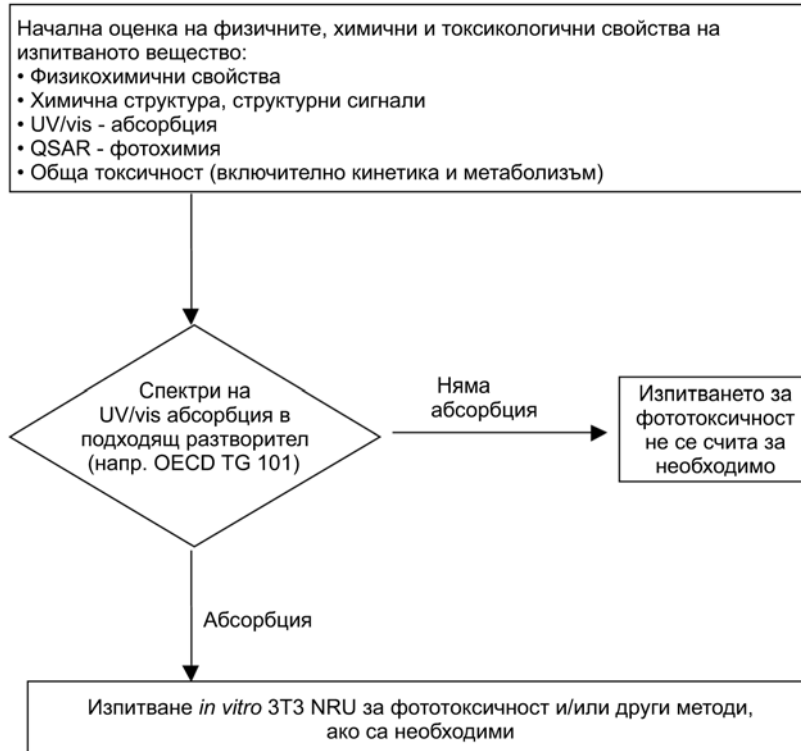
▼B

12. Lambert L.A., Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In „Dermatotoxicology“, edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515—530.
13. Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Res.*, 47, 1825—1829.
14. ISO 10977. (1993). Photography — Processed photographic colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.
15. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumination, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275
16. ZEBET/ECVAM/COLIPA — Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.
17. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC*, in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. *ATLA* 26, 679—708.
18. Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. *J. Biol. Systems* 3, 127—138.
19. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. *ATLA*, 25, 445—462.
20. http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼ B

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Роля на изпитването ЗТЗ NRU за фототоксичност в последователния подход към изпитването за фототоксичност на веществата

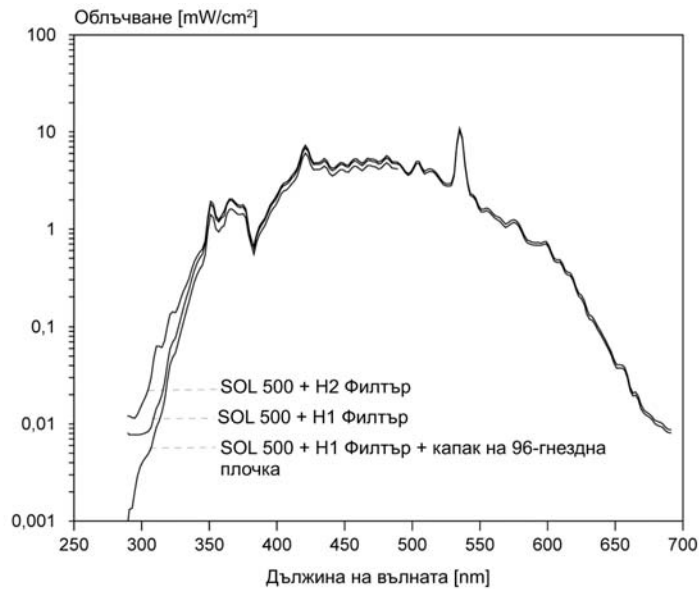


▼В

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Фигура 1

Спектрално разпределение на мощността на филтриран слънчев симулатор



(виж секция 1.4.1.5, втори параграф)

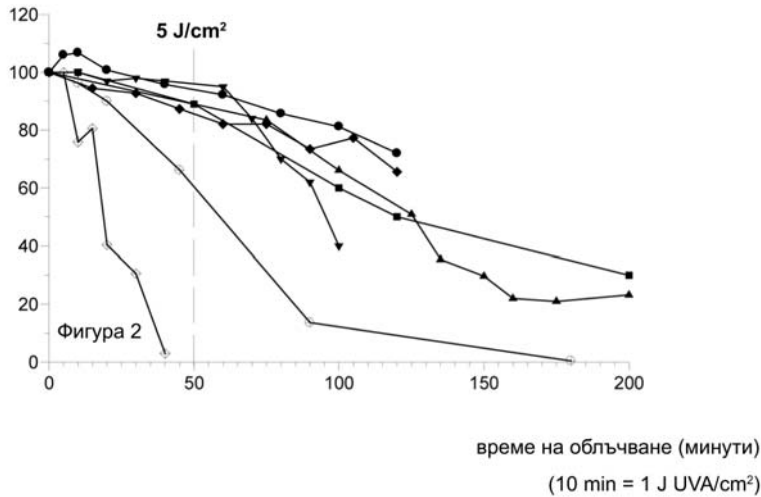
Фигура 1 дава пример за приемливо спектрално разпределение на облъчването от слънчев симулатор с филтър. Той е от подобрен метал халогенен източник, използван за валидиращото изпитване на изпитването ЗТЗ NRU за фототоксичност (6)(8)(17). Показани са ефектът от двата различни филтъра и допълнителният филтриращ ефект на капака на 96-гнездната плочка за клетъчни култури. Филтърът H2 беше използван само със системи на изпитване, които могат да толерират по-високи количества UVB (изпитване върху модел на кожа и изпитване на червени кръвни тела за фото-хемолиза). При изпитването ЗТЗ NRU за фототоксичност е използван филтърът H1. Фигурата показва, че допълнителният филтриращ ефект на капака на плочката се наблюдава главно в обхвата UVB, като все пак оставя достатъчно UVB в спектъра на облъчване, за да възбуди веществата, които типично поглъщат в UVB обхвата като Амиодарон (виж таблица 1).

▼В

Фигура 2

Чувствителност на облъчване на клетките Valb/c 3T3 (както е измерена в UVA обхвата)

Клетъчна жизнеспособност (% погълчане на Неутрално червено от контроли на тъмно)



(вижте секция 1.4.1.5.2, втори параграф; 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Чувствителността на клетките Valb/c 3T3 на облъчване със слънчев симулатор, използван във валидиращото изпитване на изпитването 3T3NRU за фототоксичност, както е измерена в UVA обхвата. Фигурата показва резултатите, измерени в 7 различни лаборатории в предварителното валидиращо изследване (1). Докато двете криви с незапълнени символи са получени от остарели клетки (висок брой на преминавания), които е трябвало да бъдат заменени с нови клетки, кривите с пълни символи показват клетки с приемлив толеранс на облъчване.

От тези данни беше получена най-високата нецитотоксична доза на облъчване 5 J/cm² (вертикалната пунктирна линия). Хоризонталната пунктирна линия допълнително показва максимално допустимия ефект на облъчване, посочен в параграф 1.4.2.2.

▼ M3

Б.42. КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛОКАЛНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ**ВЪВЕДЕНИЕ**

1. Указанията за изпитването на химикали на Организацията за икономическо сътрудничество и развитие (ОИСР) и основаните на тях методи на ЕС за изпитване периодично се преразглеждат във връзка с научния прогрес, промяната на регулаторните нужди и съображенията, свързани с хуманното отношение към животните. Първоначалният метод за изпитване (МИ) за определянето на кожна сенсibiliзация при мишки — Изследването на локалните лимфни възли (LLNA; Указание за изпитване 429 на ОИСР; глава Б.42 от настоящото приложение) — беше приет по-рано (1). Публикувана е подробна информация за валидирането на LLNA и е направен преглед на съответните научни трудове (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Актуализираното LLNA се основава на оценката на опита и научните данни (12). Това е вторият МИ, предназначен за оценка на потенциала на химикалите (вещества и смеси) да предизвикват кожна сенсibiliзация при животни. При другия МИ (т.е. Указание за изпитване 406 на ОИСР; глава Б.6 от настоящото приложение) се използват тестове върху морски свинчета, по-специално максимизиращ тест върху морски свинчета и тест на Buehler (13). LLNA има предимства в сравнение с Б.6 и Указание за изпитване 406 на ОИСР (13) по отношение на хуманното отношение към животните. Настоящият актуализиран метод за изпитване LLNA включва набор от стандарти за ефективност (СЕ) (допълнение 1), които могат да се използват за оценка на статуса на валидиране на нови и/или модифицирани методи за изпитване, които са функционално и по своя механизъм сходни с LLNA, в съответствие с принципите на Ръководство № 34 на ОИСР (14).
2. При LLNA се проучва индукционната фаза на кожна сенсibiliзация и се получават количествени данни, подходящи за оценяване на зависимостта доза—отговор. Следва да се отбележи, че слабите — умерени сенсibiliзатори, които се препоръчват като подходящи положителни контролни химикали (ПК) при методите за изследване върху морски свинчета (т.е. Б.6 и Указание за изпитване 406 на ОИСР) (13), са подходящи за използване и при LLNA (6) (8) (15). Подходът на ограничено изследване на локалните лимфни възли (rLLNA), при който биха могли да се използват до 40 % по-малко животни, също е описан като възможност в настоящия МИ (16) (17) (18). Изследването rLLNA може да се използва, когато е налице регулаторна необходимост да се потвърди отрицателна прогноза за кожно-сенсibiliзиращ потенциал, при условие че се спазват всички други протоколни спецификации за LLNA, описани в настоящия МИ. Прогнозата за отрицателен резултат следва да бъде направена въз основа на цялата налична информация, както е описано в точка 4. Преди прилагането на подхода rLLNA следва да се посочат ясни основания и научна обосновка за неговото използване. Ако въпреки очакванията при rLLNA се получи положителен или неясен резултат, може да е необходимо допълнително изпитване за тълкуване или изясняване на резултата. Изследването rLLNA не трябва да се използва за определянето на опасността от изпитвани вещества, предизвикващи кожна сенсibiliзация, когато е необходима информация за зависимостта доза—отговор, като например при подкатегоризация за Регламент (ЕО) № 1272/2008 относно класифицирането, етикетирането и опаковането на вещества и смеси и Глобалната хармонизирана система за класифициране и етикетирание на химикали (GHS) на Организацията на обединените нации (ООН).

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

3. Определенията са дадени в допълнение 2.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

4. LLNA осигурява алтернативен метод за определяне на химикали, които са потенциални кожни сенсibiliзатори. Това не означава непременно, че при всички случаи следва да се използва LLNA вместо тестове върху морски свинчета, (т.е. глава Б.6, Указание за изпитване 406 на ОИСР) (13), а по-скоро че изпитването е равностойно и може да бъде използвано като алтернатива, при която обикновено положителните и

▼ M3

отрицателните резултати не се нуждаят от допълнително потвърждаване. Лабораторията, провеждаща теста, следва да вземе предвид цялата налична информация за изпитваното вещество преди провеждането на теста. Тази информация следва да включва идентичността и химичната структура на изпитваното вещество; неговите физико-химични свойства; резултатите от всякакви други *in vitro* или *in vivo* токсикологични тестове на изпитваното вещество; и токсикологични данни за структурно подобни вещества. Тази информация следва да се вземе предвид, за да се определи дали LLNA е подходящо за веществото (с оглед на неприложимостта на LLNA по отношение на ограничен брой видове химикали — вж. точка 5) и като помощно средство при избора на доза.

5. LLNA е *in vivo* метод и вследствие на това няма да доведе до преустановяване на използването на животни при оценяването на алергичната контактна сенсibiliзираща активност. При все това този метод дава възможност да се намали броят на животните, изисквани за тази цел. Освен това LLNA предлага съществено подобрене (изразяващо се в намаление на болката и страданието) на начина, по който животните се използват за изпитване на алергичната контактна сенсibiliзация. LLNA се основава на отчитането на имунологичните ефекти, стимулирани от химикалите по време на индукционната фаза на сенсibiliзирането. За разлика от изследванията върху морски свинчета (т.е. глава Б.6, Указание за изпитване 406 на ОИСП) (13), LLNA не изисква да се разкрие кожна свръхчувствителност след предизвикване. Освен това LLNA не изисква употребата на адювант, както в случаите на максимизиращото изследване върху морски свинчета (13). По такъв начин при използване на LLNA се намаляват болката и страданието на животните. Въпреки предимствата на LLNA пред Б.6 и Указание за изпитване 406 на ОИСП, следва да се признае, че съществуват определени ограничения, които могат да доведат до необходимост от използване на Б.6 или на Указание за изпитване 406 на ОИСП (13) (напр. фалшиво отрицателни резултати при LLNA по отношение на някои метали, фалшиво положителни резултати при определени кожни дразнителни) [например някои видове повърхностноактивни химикали] (19) (20) или разтворимост на изпитваното вещество). Освен това химичните класове или вещества, съдържащи функционални групи, за които е доказано че водят до възможно обръкване (21), могат да породят необходимост от използване на изследванията върху морски свинчета (т.е. Б.6; Указание за изпитване 406 на ОИСП) (13). Също така, въз основа на ограничената валидационна база данни, която се състои предимно от пестицидни препарати, LLNA е по-вероятно да даде положителен резултат за тези видове изпитвани вещества в сравнение с изследването върху морски свинчета (22). При изпитването на препарати, обаче, следва да се обмисли включването на подобни вещества с известни резултати като еталонни вещества, за да се докаже правилното функциониране на LLNA (вж. точка 16). С изключение на тези установени ограничения, LLNA би следвало да е приложимо за изпитване на всички вещества, освен ако съществуват свързани с тези вещества свойства, които могат да повлияят на точността на LLNA.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

6. Основният принцип, залегнал в LLNA, е, че сенсibiliзаторите предизвикват пролиферация на лимфоцитите в лимфните възли, дрениращи мястото на прилагане на изпитваното вещество. Тази пролиферация е пропорционална на дозата и на потенциала на приложени алерген и осигурява лесен начин за получаване на количествено измерване на сенсibiliзацията. Пролиферацията се измерва чрез сравняване на средната пролиферация във всяка изпитвана група със средната пролиферация в третираната само с носителя контролна група (КН). Определя се съотношението на средната пролиферация във всяка третирана група спрямо тази в паралелната третирана само с носителя контролна група, наречено стимулационен индекс (SI), който следва да е ≥ 3 , за да може изпитваното вещество да бъде класифицирано като потенциален кожен сенсibiliзатор. Описаните тук процедури се основават на използването на радиоактивно маркиране *in vivo* за измерване на увеличаване брой на пролифериращите клетки в дрениращите аурикуларни (ушни) лимфни възли. От друга страна обаче, за оценка на броя на пролифериращите клетки могат да бъдат използвани други подходи, при условие че са спазени напълно изискванията за стандартите за ефективност (допълнение 1).

▼ **M3****ОПИСАНИЕ НА ИЗПИТВАНЕТО****Избор на животински вид**

7. Биологичният вид, избран за това изследване, е мишката. Използват се млади възрастни мишки от женски пол от порода СВА/Са или СВА/Ј, които не са раждали и не са бременни. В началото на изследването животните следва да бъдат на възраст 8—12 седмици и отклоненията в теглото им следва да бъдат минимални и да не превишават 20 % от средното тегло. Алтернативно могат да бъдат използвани животни от други породи и от мъжки пол, когато има достатъчно събрани данни, които доказват, че не съществуват съществени различия при реакцията при LLNA, обусловени от пола и/или породата.

Условия на отглеждане и хранене

8. Мишките следва да бъдат групово отглеждани (23), освен ако е дадена подходяща научна обосновка за индивидуално отглеждане на мишките. Температурата в стаята на опитните животни следва да бъде 22 ± 3 °C. При все че относителната влажност следва да бъде поне 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 следва да бъде изкуствено, с последователност 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. За храненето могат да се използват обичайните лабораторни диети с неограничен достъп до вода за пиене.

Подготовка на животните

9. Животните се избират произволно, маркират се, за да е възможно индивидуалното им идентифициране (но не и чрез маркиране на ушите им) и се оставят в клетките им поне пет дни преди започване на дозирането, за да се аклиматизират към лабораторните условия. Всички животни се изследват преди да започне третирането, за да се потвърди отсъствието на видими кожни лезии.

Приготвяне на разтворите за дозиране

10. Твърдите химикали следва да се разтворят или суспендират в разтворители/носители и ако е необходимо, да се разреждат преди прилагането им върху ушите на мишките. Течните химикали могат да се прилагат в чист или разреден вид преди дозирането. Неразтворимите химикали като тези, които обикновено се наблюдават в медицинските изделия, следва да се подложат на засилена екстракция в подходящ разтворител, за да се проявят всички екстрахируеми съставки за изпитване преди прилагането им върху ушите на мишките. Изпитваните вещества следва да се приготвят ежедневно, освен ако данните за устойчивостта им показват, че те могат да се съхраняват.

Проверка на надеждността

11. Използват се положителни контролни химикали (ПК) за доказване на подходящо провеждане на изследването чрез реагиране с достатъчна и възпроизводима чувствителност като сенсibiliзиращо изпитвано вещество, за което степента на реакция е добре характеризирана. Препоръчва се включването на паралелна положителна контрола (ПК), защото тя доказва компетентността на лабораторията успешно да провежда всяко изследване и позволява оценка на вътрешно- и междулабораторната възпроизводимост и сравнимост. Освен това някои регулаторни органи изискват положителна контрола за всяко изпитване и поради това е препоръчително ползвателите на метода да се консултират със съответните органи преди провеждането на LLNA. В съответствие с това се насърчава рутинното използване на паралелна положителна контрола, за да се избегне необходимостта от допълнително изследване върху животни за спазване на изисквания, които биха могли да възникнат при използването на периодична положителна контрола (вж. точка 12). Положителната контрола следва да предизвиква положителна реакция при LLNA при ниво на експозиция, при което се очаква нарастване на стимулационния индекс $SI > 3$ спрямо отрицателната контролна група (ОК). Дозата за ПК следва да бъде избрана така, че да не причинява прекомерно кожно дразнене или системна токсичност и индукцията да е възпроизводима, но не прекомерна (напр. $SI > 20$ би било прекомерно). Предпочитаните положителни контроли са 25 % хексилканелен алдехид (№ 101-86-0

▼ M3

съгласно химичния регистър на Службата за химични индекси — Chemical Abstracts Service [CAS]) в ацетон: зехтин (4:1, об./об.) и 5 % меркаптобензотиазол (CAS № 149-30-4) в *N,N*-диметилформамид (вж. допълнение 1, таблица 1). Може да има обстоятелства, при които след подходяща обосновка могат да бъдат използвани и други положителни контроли, отговарящи на горепосочените критерии.

12. При все че е препоръчително постоянното включване на паралелна положителна контролна (ПК) група, могат да съществуват ситуации, при които прилагането на периодично изпитване (т.е. на интервали ≤ 6 месеца) на ПК може да е подходящо за лаборатории, които редовно провеждат LLNA (т.е. провеждат LLNA не по-малко от веднъж месечно) и имат създадена база данни от предишни изпитвания с ПК, доказваща способността на лабораторията да получава възпроизводими и точни резултати с положителните контроли. Подходящата компетентност за провеждане на LLNA може да бъде успешно доказана чрез получаването на последователни положителни резултати с ПК при най-малко 10 независими изпитвания, проведени в рамките на разумно продължителен период от време (т.е. по-малко от една година).
13. Винаги следва да се включва паралелна ПК група, когато има процедурна промяна в LLNA (например промяна на обучения персонал, промяна на материалите и/или реагентите, с които се провежда методът за изпитване, промяна на оборудването, с което се провежда методът за изпитване, промяна в произхода на опитните животни), като тези промени следва да бъдат документирани в лабораторните доклади. Следва да се обърне внимание на въздействието на тези промени върху годността на предварително създадената база данни от предишни изпитвания с оглед да се определи необходимостта от създаване на нова база данни от предишни изпитвания за документирани на последователността на резултатите с ПК.
14. Изследователите следва да са наясно, че решението за периодично провеждане на изпитване с положителна контрола вместо паралелното му провеждане има последици върху адекватността и приемливостта на отрицателните резултати от изпитването, получени без паралелна положителна контрола по време на интервала между всяко периодично изпитване с положителна контрола. Например, ако се получи погрешен отрицателен резултат при периодичното изпитване с положителна контрола, отрицателните резултати за изпитваното вещество, получени по време на интервала между последното приемливо периодично изпитване с положителна контрола и неприемливото периодично изпитване с положителна контрола, могат да бъдат поставени под съмнение. Изводите относно тези резултати следва внимателно да се проучат, когато се взема решение дали да се включват паралелни ПК или само да се провеждат периодични ПК. Следва да се проучи и възможността за използване на по-малко животни в паралелната ПК група, когато това е научно обосновано и ако лабораторията докаже, въз основа на конкретните за лабораторията данни от предишни изпитвания, че могат да бъдат използвани по-малко мишки (12).
15. Въпреки че положителната контрола следва да бъде изпитвана с носителя, за който е известно, че при прилагането му се получава постоянна реакция (напр. ацетон: зехтин; 4:1, об./об.), може да има определени регулаторни ситуации, при които да е необходимо също провеждането на изпитване с нестандартен носител (клинично/химично отговаряща формулация) (24). Ако паралелната положителна контрола се изпитва с различен носител от изпитваното вещество, тогава следва да се включи отделна третирана само с носителя контролна група за паралелната положителна контрола.
16. В случаи, при които се оценяват изпитвани вещества от определен химичен клас или спектър от реакции, от полза могат да бъдат и еталонните вещества, за да се докаже, че методът за изпитване функционира правилно по отношение на откриването на потенциала за кожна сенсibiliзация на тези видове изпитвани вещества. Подходящите еталонни вещества следва да притежават следните свойства:
 - структурно и функционално сходство с класа на изпитваното вещество;
 - известни физични/химични характеристики;
 - подкрепящи данни от LLNA;
 - подкрепящи данни от други животински модели и/или от хора.

▼ M3

ПРОЦЕДУРА НА ИЗПИТВАНЕ

Брой на животните и нива на дозите

17. Използват се минимум четири животни за подложена на дадена доза група, при минимум три концентрации на изпитваното вещество, плюс паралелна отрицателна контролна група (ОК), третирана само с носителя на изпитваното вещество, както и положителна контрола (паралелна или неотдавнашна въз основа на лабораторната политика като се вземат предвид точки 11—15). Следва да се разгледа възможността за изпитване на множество дози на положителната контрола, особено когато не се провеждат редовни изпитвания на ПК. Животните от контролните групи следва да бъдат отглеждани и третирани по начин, идентичен с този на животните от третираните групи, с изключение на това, че липсва третиране с изпитваното вещество.
18. Изборът на доза и носител следва да се базира на препоръките, посочени в литературните източници (3) и (5). Последователните дози обикновено се избират от подходяща поредица от концентрации като например 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % и т.н. Изборът на използваната поредица от концентрации следва да бъде придружен от подходяща научна обосновка. В случаите когато има съответна информация, при избора на трите последователни концентрации следва да бъде взета предвид цялата съществуваща токсикологична информация (напр. остра токсичност и кожно дразнене) и информацията за структурните и физикохимичните свойства на представящото интерес изпитвано вещество (и/или структурно свързаните вещества), така че най-високата концентрация да увеличава в максимална степен експозицията, като същевременно се избягва систематична токсичност и/или прекомерно локално кожно дразнене (3) (25). При липсата на такава информация може да е необходимо първоначално предварително скринингово изпитване (вж. точки 21—24).
19. Носителят не следва да пречи или да оказва влияние на резултата от изпитването и следва да бъде избран въз основа на способността си максимално да повишава разтворимостта, за да се получи най-високата постижима концентрация, като същевременно се приготвя подходящ разтвор/суспензия за прилагане на изпитваното вещество. Препоръчителните носители са ацетон: зехтин (4:1, об./об.), *N,N*-диметилформамид, метилетилкетон, пропилен гликол и диметилсулфоксид (19), но могат да бъдат използвани и други, при условие че се предостави достатъчна научна обосновка. При определени ситуации може да бъде необходимо да се използват в качеството на допълнителна контрола клинично използван разтворител или търговски препарат, в състава на който изпитваното вещество се предлага на пазара. Следва да се положи специална грижа за да се осигури, че хидрофилните изпитвани вещества се влагат в среда от носители, която навлажнява кожата и не се стича веднага, чрез инкорпорирането на подходящи солюбилизатори (напр. 1 % плуроник — Pluronic® L92). Поради тази причина трябва да се избягват носителите на изцяло водна основа.
20. Обработката на лимфни възли на отделни мишки дава възможност за оценка на варибилността между животните и за статистическо сравнение на разликата между изпитваното вещество и измерванията в третираната с носителя контролна група (вж. точка 35). В допълнение към това е възможно оценяването на възможността за намаляване на броя на мишките в ПК група, когато са събрани индивидуални данни за отделните животни (12). Освен това някои регулаторни органи изискват събирането на индивидуални данни за отделните животни. Въпреки това сборните данни за животните могат да бъдат сметени за приемливи от някои регулаторни органи и в такива случаи ползвателите имат възможността да събират или индивидуални, или сборни данни за животните.

Предварително скринингово изпитване

21. При липса на информация за определянето на най-високата доза за изпитване (вж. точка 18) следва да се извърши предварително скринингово изпитване, за да се определи подходящото ниво на дозата за изпитване при LLNA. Целта на предварителното скринингово изпитване е да осигури данни за избор на максималното ниво на дозата, което да бъде използвано в основното изпитване LLNA в случаите, когато не е налична информация за концентрацията, причиняваща системна токсичност (вж. точка 24) и/или прекомерно локално кожно дразнене (вж. точка 23). Изпитваното максимално ниво на дозата следва да се състои от 100 % чисто изпитвано вещество (за течностите), или да е с максималната възможна концентрация (за твърдите вещества или суспензиите).

▼ M3

22. Предварителното скринингово изпитване следва да се провежда при условия, идентични на тези в основното изпитване LLNA, с изключение на това, че не се оценява пролиферацията на лимфните възли и могат да се използват по-малко животни за подложена на определена доза група. Предлага се използването на едно или две животни за подложена на определена доза група. Всички мишки се наблюдават ежедневно за всякакви клинични признаци за системна токсичност или локално дразнене на мястото на прилагане. Телесните тегла се записват преди изпитването и преди завършването му (ден 6). И двете уши на всяка мишка се наблюдават за еритема и резултатите се отчитат, като се използва таблица 1 (25). Измерванията на дебелината на ушите се правят, като се използва измервателен уред за дебелина (напр. цифров микрометър или измервателен уред за дебелина Peacock Dial) в ден 1 (преди дозирането), ден 3 (приблизително 48 часа след първата доза) и ден 6. Освен това дебелината на ушите в ден 6 може да се определи чрез продупчване на ушите и определяне на теглото на взетите продупчени части, което следва да се извърши след като животните бъдат умъртвени по хуманен начин. Показател за прекомерното локално кожно дразнене е балова оценка на еритемата ≥ 3 и/или увеличаване на дебелината на ушите в размер на $\geq 25\%$ в който и да било от дните с измервания (26) (27). Най-високата доза, избрана за основното изпитване LLNA, ще бъде следващата по-ниска доза от поредицата от концентрации в предварителното скринингово изпитване (вж. точка 18), която не причинява системна токсичност и/или прекомерно локално кожно дразнене.

Таблица 1

Оценки на еритемата

Наблюдение	Балова оценка
Отсъствие на еритема	0
Много слаба еритема (едва забележима)	1
Добре изразена еритема	2
Умерена до тежка еритема	3
Тежка еритема (силно зачервяване — с цвят на цвекло) до образуване на есхара, което не позволява да се отчете баловата оценка на еритемата	4

23. В допълнение към увеличаването на дебелината на ушите с 25% (26) (27), за идентифициране на дразнителите при LLNA също така се използва статистически значимо увеличаване на дебелината на ушите при третирани мишки в сравнение с контролните мишки (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Въпреки това, макар че могат да възникнат статистически значими увеличения, когато дебелината на ушите е по-малка от 25% , те не са конкретно свързани с прекомерното дразнене (30) (32) (33) (34).
24. Следните клинични наблюдения могат да покажат наличие на системна токсичност (35) (36), когато се използват като част от интегрална оценка, и поради това могат да посочат какво следва да е максималното ниво на дозата, което да се използва в основното LLNA изпитване: промени във функционирането на нервната система (напр. пилоерекция, атаксия, тремори и конвулсии); промени в поведението (напр. агресивност, промяна в хигиената на тялото, изразена промяна в нивото на активност); промени в начина на дишане (т.е. промени в честотата и интензивността на дишането като диспнея, задъханост и хрипове) и промени в консумацията на храна и вода. Освен това в оценката следва да бъдат взети предвид признаци на летаргия и/или липса на реакция и всякакви клинични признаци на нещо повече от лека или момента болка и страдание или намаляване на телесното тегло $> 5\%$ от ден 1 до ден 6, както и смъртността. Умиращите животни, както и животните, които очевидно изпитват болка или показват признаци на тежко и продължително страдание, следва да бъдат умъртвени по хуманен начин (37).

▼ M3

Експериментален график на основното изпитване

25. Експерименталният график на изпитването е, както следва:

- *Ден 1:* Индивидуално се идентифицира и записва теглото на всяко животно и всяко клинично наблюдение. Прилага се 25 µL подходящо разреден разтвор на изпитваното вещество, както и самостоятелно носителят или положителната контрола (паралелна или неотдавнашна въз основа на лабораторната политика, като се вземат предвид точки 11—15), в горната част на всяко ухо.
- *Дни 2 и 3:* Повтаря се процедурата по прилагане, извършена в ден 1.
- *Дни 4 и 5:* Няма третиране.
- *Ден 6:* Записва се теглото на всяко животно. Инжектира се 250 µL стерилен буферен физиологичен разтвор с фосфат (PBS), съдържащ 20 µCi ($7,4 \times 10^5$ Bq) тритиев (^3H)-метил тимидин на всички изследвани и контролни мишки през опашната вена. Алтернативно се инжектира 250 µL стерилен PBS, съдържащ 2 µCi ($7,4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I -йододооксиуридин и 10^{-5}M флуородооксиуридин на всички мишки през опашната вена. Пет часа (5 h) по-късно животните се умъртвяват по хуманен начин. Дрениращите аурикуларни (ушни) лимфни възли от всяко ухо на мишката се отрязват и се обработват заедно в PBS за всяко животно (индивидуален подход към животните); алтернативно лимфните възли от всяко ухо се отрязват и събират в PBS за всяка третирана група (общ подход за третиране на групата). Подробности и диаграми за идентифицирането и дисекцията на лимфните възлите могат да бъдат намерени в позоваване (12). За допълнително наблюдение на локалната кожна реакция при основното изпитване в протокола от изпитването могат да бъдат включени допълнителни параметри като оценяване на ушната еритема или измервания на дебелината на ушите (получени или чрез използването на измервателен уред за дебелината, или чрез продупчване на ушите и определяне на теглото на взетите продупчени части при аутопсията).

Приготвяне на клетъчни суспензии

26. Клетъчна суспензия от единични клетки се приготвя от клетки от лимфните възли (КЛВ), отрязани двустранно, като се използва индивидуалният подход към животните или алтернативно общият подход за третиране на групата, чрез леко механично раздробяване през 200-микронни отвори на мрежа от неръждаема стомана или чрез друга приемлива техника за получаване на клетъчна суспензия от единични клетки. Клетките от лимфните възли се измиват двукратно с голямо количество PBS и ДНК-то се преципитира с 5 % трихлороцетна киселина (TCA) при 4 °C в продължение на 18 часа (3). Малките сферични топчета или повторно се суспендират в 1 ml TCA и се прехвърлят в сцинтилационни стъкленици, съдържащи 10 mL сцинтилационна течност за ^3H -преброяване, или се прехвърлят директно в гама бройтелни епруветки за ^{125}I -преброяване.

Определяне на клетъчната пролиферация (инкорпорирана радиоактивност)

27. Инкорпорирането на ^3H -метил тимидин се измерва чрез β -сцинтилационен брояч като разпадане (дезинтегриране) за минута (DPM). Инкорпорирането на ^{125}I -йододооксиуридин се измерва чрез ^{125}I -брояч и също се изразява като DPM. В зависимост от използвания подход инкорпорирането се изразява като DPM/мишка (индивидуален подход към животните) или DPM/третирана група (общ подход за третиране на групата).

Ограничено LLNA

28. В определени случаи, когато е налице регулаторна необходимост да се потвърди отрицателна прогноза за потенциален кожен сенсibilизатор, може да се използва незадължителен протокол за rLLNA (16) (17) (18), при който се използват по-малко животни, при условие че се спазват всички други протоколни спецификации за LLNA, описани в настоящия МИ. Преди прилагането на подхода rLLNA следва да се предоставят ясни основания и научна обосновка за неговото използване. Ако се получи положителен или неясен резултат, може да е необходимо допълнително изпитване за тълкуване или изясняване на резултата.

▼ M3

29. Намаляването на броя подложени на различни дози групи е единствената разлика между протоколите за методите на изпитване LLNA и gLLNA и поради тази причина gLLNA не предоставя информация за зависимостта доза—реакция. Следователно gLLNA не трябва да се използва, когато е необходима информация за зависимостта доза—реакция. Както при използването множество дози LLNA, концентрацията на изпитваното вещество, оценявана при gLLNA, следва да бъде максималната концентрация, която не причинява явна систематична токсичност и/или прекомерно локално кожно дразнене на мишката (вж. точка 18).

НАБЛЮДЕНИЯ

Клинични наблюдения

30. Всяка мишка следва да бъде внимателно наблюдавана поне веднъж дневно за всякакви клинични признаци за локално дразнене на мястото на прилагане или за систематична токсичност. Всички наблюдения следва систематично да се записват, като се водят дневници за всяка мишка. Плановете за наблюдение следва да включват критерии за бързото идентифициране на мишките, които показват признаци на систематична токсичност, прекомерно локално кожно дразнене или корозивност на кожата, за да бъдат подложени на евтаназия (37).

Телесни тегла

31. Както е посочено в точка 25, индивидуалните телесни тегла на животните следва да бъдат измерени в началото на изпитването и при планираното умъртвяване на животните по хуманен начин.

ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

32. Резултатите за всяка третирана група се изразяват чрез стимуляционния индекс (SI). Когато се използва индивидуалният подход към животните, SI се получава чрез разделяне на средната стойност на DPM/мишка във всяка група, изследвана с изпитваното вещество, както и в положителната контролна група, на средната стойност на DPM/мишка за контролната група, третирана само с разтворителя/носителя. Средната стойност на SI за контролите, третирани само с носителя, е единица. Когато се използва общият подход за третиране на групата, SI се получава чрез разделяне на общото радиоактивно инкорпориране за всяка третирана група на инкорпорирането на общата третирана само с носителя контролна група; така се получава средният SI.
33. При процеса на вземане на решение, даден резултат се счита за положителен, когато $SI \geq 3$. При гранични резултати, обаче, могат да бъдат взети предвид и силата на зависимостта доза—отговор, статистическата значимост и съответствието на реакциите при третиране с разтворител/носител и ПК реакциите (4) (5) (6).
34. Ако е необходимо изясняване на получените резултати, следва да се обърне внимание на различните свойства на изпитваното вещество, включително дали то има структурна връзка с познати кожни сенсори, дали причинява прекомерно кожно дразнене при мишките, както и на естеството на наблюдаваната зависимост доза—отговор. Тези и други съображения подробно се обсъждат на друго място (7).
35. Събирането на данни за радиоактивността на нивото на отделните мишки дава възможност за статистически анализ на наличието и степента на зависимостта доза—отговор в данните. Всяка статистическа оценка би могла да включва оценка на зависимостта доза—отговор, както и подходящо направени сравнения между изпитваните групи (напр. сравнения по двойки на третирани с определени дози групи съответно с паралелната третирана с носител контролна група). Статистическите анализи могат например да включват линейна регресия или изпитването на William за оценка на тенденциите в зависимостта доза—отговор и изпитването на Dunnett за сравнения по двойки. При избора на подходящ метод за статистически анализ изследователят следва да обърне внимание на възможни различия в дисперсиите и други свързани с тях проблеми, които могат да наложат трансформация на данните или провеждане на статистически анализ без параметри. Във всеки случай на изследователя може да му се наложи да извърши изчисления за SI и статистически анализи със и без определени точки с данни (понякога наричани „отклоняващи се стойности“).

▼ **M3****ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ****Данни**

36. Данните следва да бъдат обобщени в табличен вид. Когато се използва индивидуалният подход към животните, се посочват индивидуалните DPM стойности за отделните животни, средната за групата стойност DPM/животно, съответните граници на отклонения (напр. SD, SEM) и средният SI за всяка подложена на дадена доза група в сравнение с паралелната третирана с носителя контролна група. Когато се използва общият подход за третиране на групата, се посочва средната/междинната DPM стойност и средният SI за всяка подложена на дадена доза група в сравнение с паралелната третирана с носителя контролна група.

Протокол от изпитването

37. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитвани и контролни вещества:

- идентификационни данни (напр. CAS и EC номера, ако са налични; източник, чистота, известни примеси, номер на партидата);
- физична форма и физикохимични свойства (напр. летливост, устойчивост, разтворимост);
- ако е смес, състав и относително съотношение в проценти на елементите.

Разтворител/носител:

- идентификационни данни (чистота; концентрация, където е подходящо; използвано количество);
- обосновка за избора на носител.

Опитни животни:

- произход на мишките от порода CBA;
- микробиологичен статус на животните, ако е известен;
- брой и възраст на животните;
- произход на животните, условия на отглеждане, диета и т.н.

Условия на изпитване:

- подробна информация за приготвянето и прилагането на изпитваното вещество;
- обосновка за избора на доза (включително резултатите от предварителното скринингово изпитване, ако е проведено);
- използвани концентрации на изпитваното вещество и носителя и общо количество на приложеното изпитвано вещество;
- подробна информация за качеството на храната и водата (включително вид/източник на диетата, водоизточник);
- подробна информация за графици на третиране и вземане на проби;
- методи за измерване на токсичността;
- критерии за считане на изпитванията за положителни или отрицателни;
- подробна информация за всякакви отклонения от протокола и обяснение за това как отклонението влияе на планирането на изпитването и на резултатите от него.

Проверка на надеждността:

- обобщение на резултатите от последната проверка на надеждността, включително информация за използваните изпитвано вещество, концентрация и носител;
- данни за паралелни и/или предишни положителни контроли и паралелни отрицателни контроли в лабораторията, провеждаща изпитването;

▼ M3

- ако не е била включена паралелна положителна контрола, посочва се датата и лабораторният доклад на най-скорошното периодично изпитване с положителна контрола и доклад, в който подробно се представят данните от предишни изпитвания с положителни контроли на лабораторията, обосноваващ защо не се провежда паралелна положителна контрола.

Резултати:

- индивидуални тегла на мишките в началото на дозирането и при планираното им умъртвяване; както и средната стойност и границата на отклонение (напр. SD, SEM) за всяка третирана група;
- признаци на токсичност и време на настъпването им, включително кожно дразнене на мястото на прилагане, ако има такова, за всяко животно;
- таблица на DPM стойностите и стойностите на SI за всяка мишка (индивидуален подход към животните) или средните/медианните стойности (общ подход за третиране на групата) DPM стойности и стойности на SI за всяка третирана група;
- средната стойност и съответната граница на отклонение (напр. SD, SEM) за DPM/мишка за всяка третирана група и резултатите от анализа на отклоняващите се стойности за всяка третирана група, когато се използва индивидуалният подход към животните;
- изчисленият SI и подходяща мярка за варибилността, при която се отчита варибилността между животните както в групата с изпитваното вещество, така и в контролната група, когато се използва индивидуалният подход към животните;
- зависимостта доза—отговор;
- статистически анализи, където е подходящо.

Обсъждане на резултатите:

- кратък коментар на резултатите, анализ на зависимостта доза—отговор и статистически анализ, където е подходящо, със заключение дали изпитваното вещество следва да се счита за кожен сенсibilизатор.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals № 429, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165-169.
- (3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- (5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
- (7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.

▼ M3

- (8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 258-273.
- (10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274-286.
- (11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 249-257.
- (12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. На разположение на адрес: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]
- (13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals № 406, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment № 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281-284.
- (16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.
- (17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. На разположение на адрес: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]
- (18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. На разположение на адрес: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication № 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. На разположение на адрес: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

▼ M3

- (20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreesen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, на разположение на адрес: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals № 404, Paris, France. На разположение на адрес: [http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1,00.html]
- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. На разположение на адрес: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>]
- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals № 402, Paris, France. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

▼ M3

- (36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, на разположение на адрес: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]
- (37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment № 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

▼ **M3***Допълнение 1***Стандарти за ефективност, предназначени за оценка на предложени сходни или модифицирани методи за изпитване LLNA за кожна сенсibilизация****ВЪВЕДЕНИЕ**

1. Предназначението на стандартите за ефективност (СЕ) е да се обявят основанията, въз основа на които новите методи за изпитване, както патентованите (т.е. защитените от авторско право, официално регистрираните с търговска марка, регистрираните), така и непатентованите, могат да бъдат определени като достатъчно точни и надеждни за целите на конкретни изпитвания. Тези СЕ, основани на валидирани и приети методи за изпитване, могат да бъдат използвани за оценяване на надеждността и точността на други сходни методи (разговорно наричани „вариантни методи“ за тестовете — „me-too“ tests), които се основават на сходни научни принципи и измерват или прогнозироват същия биологичен или токсичен ефект (14).
2. Преди приемане на модифицираните методи (т.е. на предложени потенциални подобрения на одобрен метод за изпитване) трябва да се извърши оценка за определяне на ефекта на предложените изменения върху ефективността на изпитването и степента, до която тези изменения засягат наличната информация за другите елементи на процеса на валидиране. В зависимост от броя и естеството на предложените изменения, генерираните данни и придружаващата документация за тези изменения, те следва или да бъдат предмет на същия процес на валидиране, който е описан за ново изпитване, или, ако е приложимо, на ограничена оценка на надеждността и приложимостта чрез използване на приети СЕ (14).
3. Сходните или модифицирани методи, предложени за използване съгласно настоящия метод за изпитване (МИ), следва да бъдат оценени, за да се определят надеждността и точността им, като се използват химикали, които са представителни за пълната скала на резултатите от LLNA. С оглед да се избегне своеволно използване върху животни, настойчиво се препоръчва лицата, които разработват модела, да се консултират със съответните органи преди да започнат изследвания за валидиране в съответствие със СЕ и указанията, формулирани в настоящия МИ.
4. Тези СЕ се основават на хармонизираните СЕ на Междуправителния координационен комитет за валидиране на алтернативни методи на САЩ (US-ICCVAM), Европейския център за валидиране на алтернативни методи на ЕО ЕС-ECVAM) и Японския център за валидиране на алтернативни методи (JaCVAM) (12) за оценяване на валидността на сходни или модифицирани версии на LLNA. СЕ се състоят от съществени елементи на метода за изпитване, препоръчителни референтни химикали и стандарти за точност и надеждност, на които предложеният метод следва да отговаря или които той следва да надхвърля.

1. Съществени елементи на метода за изпитване

5. Следните елементи следва да бъдат включени в протокола за метода за изпитване, за да се гарантира, че даден сходен или модифициран метод за LLNA е по своя механизъм и функционално аналогичен на LLNA и измерва същия биологичен ефект:

— изпитваното вещество следва да се прилага локално и на двете уши на мишката;

— пролиферацията на лимфоцитите следва да се измерва в лимфните възли, дрениращи мястото на прилагане на химикала за изпитване;

— пролиферацията на лимфоцитите следва да се измерва по време на индукционната фаза на кожната сенсibilизация;

▼ **M3**

- за изпитваните вещества, най-високата доза следва да бъде максималната концентрация, която не причинява системна токсичност и/или прекомерно локално кожно дразнене на мишката. За положителните референтни химикали, най-високата доза следва да бъде поне толкова висока, колкото стойностите на ЕС3 за LLNA на съответните референтни химикали (вж. таблица 1), без да причинява системна токсичност и/или прекомерно локално кожно дразнене на мишката;
- паралелна съдържаща само носител контрола следва да бъде включена във всяко изпитване и, където е подходящо, следва също да се използва паралелна положителна контрола;
- следва да се използват минимум четири животни за подложена на определена доза група;
- могат да се събират или индивидуални, или сборни данни за животните.

Ако някой от тези критерии не е изпълнен, разглежданите тук стандарти за ефективност не могат да се използват за валидиране на сходния или модифициран метод.

II. Минимален списък на референтните химикали

6. В хармонизираните СЕ на Междуведомствения координационен комитет за валидиране на алтернативни методи на САЩ (US-ICCVAM), Европейския център за валидиране на алтернативни методи на ЕО (EC-ECVAM) и Японския център за валидиране на алтернативни методи (JaCVAM) (12) е идентифициран минимален брой от 18 референтни химикала, които следва да се използват, и четири незадължителни референтни химикала (т.е. вещества, които предизвикват или фалшиво положителни, или фалшиво отрицателни резултати при LLNA в сравнение с резултатите, получени при изследвания върху човек или върху морски свинчета (Б.6 или Указание за изпитване 406 на ОИСП) (13) и следователно предоставят възможност за доказване на еднаква или по-добра ефективност, отколкото LLNA), които са включени в СЕ за LLNA. Критериите за подбор за идентифицирането на тези химикали бяха следните:

- списъкът на референтните химикали е представителен за видовете вещества, които обичайно се изпитват за откриване на потенциал за кожна сенсibiliзация, както и спектъра от реакции, които LLNA е способно да измерва или прогнозира;
- тези вещества имат ясно определена химична структура;
- за всяко от веществата имаше налични данни за LLNA от тестове върху морски свинчета (т.е. глава Б.6, Указание за изпитване 406 на ОИСП) (13), и (където това е възможно) от изследвания върху хора; както и
- тези вещества лесно могат да бъдат намерени от търговски източници.

Препоръчителните референтни химикали са посочени в таблица 1. Изпитванията, при които се използват предлаганите референтни химикали, следва да бъдат оценявани с носителя, с който са посочени в таблица 1. В случаите, в които посоченото вещество не е налично, могат да бъдат използвани други вещества, които отговарят на критериите за избор, като се предостави подходяща обосновка.

Таблица 1

Препоръчителни референтни химикали за стандартите за ефективност за LLNA

Номер	Химикали ⁽¹⁾	CAS №	Форма	Носител ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5x – 2,0x EC3	Действителен обхват на EC3	LLNA спрямо MC	LLNA спрямо рез. при хора
1	5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-он (CMI)/2-метил-4-изотиазолин-3-он (MI) ⁽⁵⁾	26172-55-4/ 2682-20-4	Течна	DMF	0,009	1	0,0045—0,018	НИ	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Твърда	АОО	0,049	15	0,025—0,099	0,02—0,094	+/+	+/+
3	4-фенилендиамин	106-50-3	Твърда	АОО	0,11	6	0,055—0,22	0,07—0,16	+/+	+/+
4	Кобалтов хлорид	7646-79-9	Твърда	DMSO	0,6	2	0,3—1,2	0,4—0,8	+/+	+/+
5	Изоевгенол	97-54-1	Течна	АОО	1,5	47	0,77—3,1	0,5—3,3	+/+	+/+
6	2-меркаптобензотиазол	149-30-4	Твърда	DMF	1,7	1	0,85—3,4	НИ	+/+	+/+
7	Цитрал	5392-40-5	Течна	АОО	9,2	6	4,6—18,3	5,1—13	+/+	+/+
8	Хидроксилмонена киселина (HCA)	101-86-0	Течна	АОО	9,7	21	4,8—19,5	4,4—14,7	+/+	+/+
9	Евгенол	97-53-0	Течна	АОО	10,1	11	5,05—20,2	4,9—15	+/+	+/+
10	Фенил бензоат	93-99-2	Твърда	АОО	13,6	3	6,8—27,2	1,2—20	+/+	+/+
11	Канелен алкохол	104-54-1	Твърда	АОО	21	1	10,5—42	НИ	+/+	+/+
12	Имидазолдинил уреа	39236-46-9	Твърда	DMF	24	1	12—48	НИ	+/+	+/+
13	Метилметакрилат	80-62-6	Течна	АОО	90	1	45— 100	НИ	+/+	+/+
14	Хлорбензен	108-90-7	Течна	АОО	25	1	Не е приложимо	Не е приложимо	-/-	-/ (*)
15	Изопропанол	67-63-0	Течна	АОО	50	1	Не е приложимо	Не е приложимо	-/-	-/+

Номер	Химикали (1)	CAS №	Форма	Носител (2)	ЕС3 % (3)	N (4)	0,5x – 2,0x ЕС3	Действителен обхват на ЕС3	LLNA спрямо МС	LLNA спрямо рез. при хора
16	Млечна киселина	50-21-5	Течна	DMSO	25	1	Не е приложимо	Не е приложимо	-/-	-/ (*)
17	Метил салицилат	119-36-8	Течна	АОО	20	9	Не е приложимо	Не е приложимо	-/-	-/-
18	Салицилова киселина	69-72-7	Твърда	АОО	25	1	Не е приложимо	Не е приложимо	-/-	-/-
Незадължителни вещества а доказване на подобрена ефективност, свързана с LLNA										
19	Натриев лаурилсулфат	151-21-3	Твърда	DMF	8,1	5	4,05—16,2	1,5—17,1	+/-	+/-
20	Етиленгликол диметакрилат	97-90-5	Течна	МЕК	28	1	14—56	НИ	+/-	+/+
21	Ксилол	1330-20-7	Течна	АОО	95,8	1	47,9—100	НИ	+/(**)	+/-
22	Никелов хлорид	7718-54-9	Твърда	DMSO	5	2	Не е приложимо	Не е приложимо	-/+	-/+

Съкращения: АОО = ацетон: зехтин (4:1, об./об.); CAS № = регистрационен номер съгласно химичния регистър на Службата за химични индекси; DMF = *N,N*-диметилформамид; DMSO = диметил сулфоксид; DNCB = 2,4-динитрохлорбензен; ЕС3 = оценена концентрация, необходима за постигането на стимуляционен индекс със стойност 3; МС = резултат от изследването върху морски свинчета (т.е. глава Б.6 или Указание за изпитване 406 на ОИСП) (13); HCA = хексилканелен алдехид; течна = течна форма; LLNA = резултат от изследването на локалните лимфни възли върху мишки (т.е. глава Б.42, Указание за изпитване 429 на ОИСП) (1); МЕК = метилетилкетон; NA = не е приложимо, тъй като стимуляционният индекс е < 3; НИ = не е изчислено, тъй като данните са получени от едно изпитване; твърда = твърда форма; носител = носител на изпитваното вещество

(*) Химикал, за който се счита, че не предизвиква кожна сенсibilизация при хората въз основа на факта, че не са констатирани клинични резултати от кожно-алергични проби, не е включен като алерген в наборите за кожно-алергични проби и не са установени докладвани случаи за сенсibilизация при хора.

(**) Няма налични данни за резултата от изследване върху морски свинчета.

(1) Химикалите следва да се приготвят ежедневно, освен ако данните за устойчивостта им показват, че те могат да се съхраняват.

(2) Поради потенциалното въздействие на различните носители върху ефективността на LLNA, следва да се използва препоръчителният носител за всеки референтен химикал (24) (32).

(3) Средна стойност, когато са налични повече от една стойности на ЕС3. За веществата даващи отрицателен резултат (т.е. със стимуляционен индекс < 3 се предоставя най-високата изпитана концентрация).

(4) Брой на изпитванията LLNA, от които са получени данните.

(5) Предлаган на пазара като Kathon CG (CAS № 55965-84-9), който представлява смес в съотношение 3:1 от CMI и MI. Относителните концентрации на всеки елемент варират от 1,1 % до 1,25 % (CMI) и 0,3 % до 0,45 % (MI). Неактивните елементи са магнезиеви соли (21,5 % до 24 %) и меден нитрат (0,15 % до 0,17 %), като останалата част на състава е вода в процентно съотношение от 74 % до 77 %. Kathon CG може лесно да бъде намерен от Sigma-Aldrich и Rohm and Haas (понастоящем Dow Chemical Corporation).

▼ M3**III. Определени стандарти за надеждност и точност**

7. Точността на сходен или модифициран метод за LLNA следва да отговаря на или да надвишава точността на CE за LLNA, когато тя се оценява чрез използване на минимално необходимите 18 референтни химикала, които следва да бъдат използвани. Новият или модифицираният метод следва да доведе до правилно класифициране въз основа на решение „да/не“. При все това новият или модифициран метод може да не класифицира правилно всички химикали от минимално необходимите референтни химикали, които следва да бъдат използвани. Ако например един от слабите сенсibiliзатори е класифициран неправилно, обосновката за неправилното класифициране и подходящите допълнителни данни (напр. резултати от изпитването, които осигуряват правилно класифициране на други вещества с физични, химични и сенсibiliзиращи свойства, подобни на свойствата на неправилно класифицирания референтен материал) могат да бъдат сметени за показващи еквивалентна ефективност. При тези обстоятелства, статусът на валидирането на новия или модифициран метод за LLNA се оценява индивидуално за всеки отделен случай.

Вътрешнолабораторна възпроизводимост

8. За да бъде определена вътрешнолабораторната възпроизводимост, следва да бъде оценен нов или модифициран метод за LLNA, като се използва сенсibiliзиращо вещество, което е добре характеризирано в LLNA. Поради това CE за LLNA се основават на варибилността на резултатите от повторни изпитвания на хексилканелен алдехид (HCA). С цел оценяване на вътрешнолабораторната надеждност, стойностите на оценената прагова концентрация (EC₃) за HCA следва да бъдат определени в четири различни случая с интервал от поне една седмица между отделните изпитвания. Признак за приемлива вътрешнолабораторна възпроизводимост е способността на дадена лаборатория във всяко едно изпитване на HCA да получава стойности на EC₃ от 5 % до 20 %, което представлява диапазон от 0,5—2,0 пъти средната EC₃ стойност, посочена за HCA (10 %) в LLNA (вж. таблица 1).

Междулабораторна възпроизводимост

9. Междулабораторната възпроизводимост на нов или модифициран метод LLNA следва да бъде оценявана като се използват две сенсibiliзиращи вещества, които са добре характеризирани в LLNA. CE за LLNA се основават на варибилността на резултатите от изпитвания на хидроксилимонена киселина (HCA) и 2,4-динитрохлоробензен (DNCB) в различни лаборатории. Стойностите на EC₃ следва да бъдат определени независимо чрез едно изпитване, проведено в поне три отделни лаборатории. За да докаже приемлива междулабораторна възпроизводимост, всяка лаборатория следва да получи стойности на EC₃ от 5 % до 20 % за HCA и от 0,025 % до 0,1 % за DNCB, което представлява интервал от 0,5—2,0 пъти средната стойност на EC₃ концентрация, посочена за HCA (10 %) и съответно, за DNCB (0,05 %) на база LLNA (вж. таблица 1).

▼ M3

Допълнение 2

Определения

Точност: степента на близост на съвпадение на резултатите от метода за изпитване и приетите референтни стойности. Това е мярка за ефективността на метода за изпитване и един от аспектите на неговата приложимост. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съвпадение“, за да се обозначи делът на верните резултати при даден метод за изпитване (14).

Еталонно вещество: вещество, което предизвиква или не предизвиква сенсбилизация, използвано като норма за сравнение с изпитваното вещество. Едно еталонно вещество следва да притежава следните свойства: i) постоянен и надежден източник; ii) структурно и функционално сходство с класа на изпитваните вещества; iii) известни физикохимични характеристики; iv) потвърждаващи данни за известни въздействия; и v) известна ефективност за постигане на желаната реакция.

Оценена прагова концентрация (EC₀₁): оценената концентрация на изпитвано вещество, която е необходима за постигането на стимулационен индекс, показващ положителна реакция.

Оценена концентрация, водеща до стимулационен индекс 3 (EC₃): оценената концентрация на изпитвано вещество, която е необходима за постигането на стимулационен индекс със стойност три.

Вещество с фалшиво отрицателен резултат: изпитвано вещество, неправилно определено като даващо отрицателен резултат или неактивно посредством даден метод за изпитване, докато в действителност е веществото дава положителен резултат или е активно.

Вещество с фалшиво положителен резултат: изпитвано вещество, неправилно определено като даващо положителен резултат или активно при дадено изпитване, докато в действителност веществото дава отрицателен резултат или е неактивно.

Опасност: потенциалът за получаване на неблагоприятен за здравето или екологичен ефект. Неблагоприятният ефект се проявява само при достатъчно голяма степен на експозиция.

Междулабораторна възпроизводимост: мярка за степента, в която различни квалифицирани лаборатории, при използване на един и същи протокол и изпитване на едни и същи вещества, могат да получат качествено и количествено сходни резултати. Междулабораторната възпроизводимост се определя по време на процесите на предварително валидиране и валидиране и показва степента, в която изпитването може да бъде трансферирано успешно между лабораториите, също наричана възпроизводимост между лабораториите (14).

Вътрешнолабораторна възпроизводимост: определяне на степента, в която квалифицирани служители в рамките на една и съща лаборатория могат да възпроизведат успешно резултатите, като използват конкретен протокол в различни моменти. Също наричана възпроизводимост в рамките на лабораторията (14).

Вариантен метод за изпитване (me-too test): разговорен израз за метод за изпитване, който е структурно и функционално сходен с валидиран и приет референтен метод за изпитване. Такъв метод за изпитване би бил кандидат за последващо валидиране. Използва се взаимозаменяемо с термина „сходен метод за изпитване“ (14).

Отклоняваща се стойност: отклоняващата се стойност е наблюдение, което подчертано се различава от други стойности в произволно избрана извадка от популация.

Стандарти за ефективност (CE): стандарти въз основа на валидиран метод за изпитване, осигуряващи основа за оценка на сравнимостта на предложен метод за изпитване, който е по своя механизъм и функционално сходен с валидирания метод. Включват: i) съществени елементи на метода за изпитване; ii) минимален списък на референтните химикали, избрани измежду химикалите, които са били използвани за доказване на приемливата ефективност на валидирания метод за изпитване; и iii) сходните нива за точност и надеждност, въз основа на получените за валидирания метод за изпитване, които предложеният метод за изпитване следва да демонстрира при оценяването чрез използване на минималния списък на референтните химикали (14).

Патентован метод за изпитване: метод на изпитване, чието производство и дистрибуция са ограничени от патенти, авторски права, търговски марки и др.

▼ M3

Осигуряване на качеството: управленски процес, при който спазването на лабораторни стандарти за изпитване, изисквания и процедури за водене на дневници, както и точността на трансфера на данни се оценява от лица, които са независими от лицата, изпълняващи изпитването.

Референтни химикали: химикали, избрани за използване в процеса на валидиране, чиито реакции по отношение на системата за *in vitro* или *in vivo* референтни изпитвания или на представляващия интерес вид вече са известни. Тези химикали следва да бъдат представителни за класовете химикали, за които се очаква да бъде използван методът на изпитване, и следва да представляват пълният спектър от реакции, които може да се очакват от химикалите, за които може да бъде използван настоящият метод: силни, слаби и отрицателни реакции. Могат да се изискват различни набори от референтни химикали за отделните етапи на процеса на валидиране, както и за отделните методи за изпитване и приложения на изпитването (14).

Приложимост: описание на взаимовръзката между изпитването и ефекта, представляващ интерес, и дали тя е значима и полезна за определена цел. Това е степента, в която изпитването правилно измерва или прогнозира биологичния ефект, представляващ интерес. Приложимостта включва проучването на точността (съответствието) на метода за изпитване (14).

Надеждност: мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да се извършва възпроизводимо в една и съща лаборатория и в различни лаборатории в течение на времето, при използване на един и същи протокол. Надеждността се оценява, като се изчислява вътрешно- и между-лабораторната възпроизводимост (14).

Кожна сенсibiliзация: имунологичен процес, който възниква, когато податлив индивид е локално изложен на химичен алерген с индуциращо действие, който предизвиква кожна имунна реакция, водеща до развиването на контактна сенсibiliзация.

Стимулационен индекс (SI): стойност, изчислявана с цел оценка на потенциала на дадено изпитвано вещество да предизвика кожна сенсibiliзация, която представлява съотношението на пролиферацията в третираните групи спрямо тази в паралелната третирана с носителя контролна група.

Изпитвано вещество (също наричано „изпитван химикал“): всяко вещество или смес, изпитвано(а) чрез използването на настоящия метод за изпитване.

Валидиран метод за изпитване: метод за изпитване, за който са извършени изследвания за валидиране за определяне на приложимостта (включително на точността) и надеждността му за конкретна цел. Важно е да се отбележи, че един валидиран метод за изпитване може да не притежава достатъчно ефективност по отношение на точността и надеждността си, за да се счита за приложим за предлаганата цел (14).

▼B**Б.43. НЕВРОТОКСИКОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ ПРИ ГРИЗАЧИ****1. МЕТОД**

Този метод е еквивалентен на ОИСП TG 424 (1997).

Този метод е предназначен да предостави информацията, необходима за потвърждаване или допълнително охарактеризиране на потенциалната невротоксичност на химикали при възрастни животни. Той може да бъде комбиниран със съществуващи методи за изпитване, чрез токсикологични изследвания с повтаряща се доза или проведен като самостоятелно изследване. Препоръчва се да бъдат направени консултации с Ръководството на ОИСП със стратегии и методи за изследване на невротоксичността (1), за да се подпомогне определянето на изследванията, основани на този метод. Това е особено важно, когато се разглеждат модификациите на наблюденията и процедурите за изпитване, както се препоръчва при рутинно прилагане на този метод. Ръководството е изготвено, за да подпомогне избора на други процедури за изследване, които се използват при определени обстоятелства.

Оценката на развитието на невротоксичността не е обект на този метод.

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

При извършването на междинна и окончателна оценка на токсикологичните характеристики на химикала, е важно да се разгледа потенциалната възможност за невротоксични ефекти. Методът за систематични изследвания при повтарящи се дози вече включва наблюдения, които прикриват потенциалната невротоксичност. Този метод за изпитване може да се използва за определяне на изследване за получаване на допълнителна информация за или която потвърждава невротоксичните ефекти, наблюдавани при систематичните токсикологичните изследвания с повтаряща се доза. Въпреки това, разглеждането на потенциалната невротоксичност в определени класове химикали може да предложи за по-подходящо оценяването чрез използването на метод, без предварителни индикации за потенциална невротоксичност от токсикологичните изследвания при повтаряща се доза. Такова разглеждане включва, например:

— наблюдение на неврологичните признаци или невропатологичните увреждания от токсикологични изследвания, различни от систематичните изследвания с повтаряща се доза, или

— структурна връзка или друга информация, която ги свързва с известни невротоксични вещества.

В допълнение, може да има други случаи, при които използването на този метод да е подходящо; за повече подробности вижте (1).

Този метод е разработен, така че да може да бъде приспособен да посрещне особените нужди от потвърждаване на специфичната хистопатологична и мотивационна невропатология на химикала, както и да осигури охарактеризиране и окачествяване на невротоксичните отговори.

▼B

В миналото невротоксикологията е била приравнявана с невропатията, включваща невропатологични увреждания или неврологични дисфункции, такива като припадъци, парализи или треперене. Освен това невропатията е важен израз на невротоксикологията. Сега е ясно, че има много други признаци за токсичност на нервната система (напр. загуба на двигателна координация, сензорен дефицит, дисфункции при заучаване и запаметяване), които не биха могли да се отразят на невропатията или други видове изследвания.

Този невротоксикологичен метод за изследване е предназначен за откриване на големи (основни) невроповеденчески и невропатологични ефекти при възрастни гризачи. Докато поведенческите ефекти, дори при отсъствие на морфологични изменения, могат да окажат вредно въздействие върху организма, не всички промени в поведението са характерни за нервната система. Поради това, всички наблюдавани изменения трябва да бъдат оценявани във връзка с корелативните хистопатологични, хематологични или биохимични данни, както и данни от други видове токсичност, засягаща целия организъм. Изследването, за което се говори в този метод, целящ да осигури възможност за охарактеризиране и количествено определяне на невротоксичните отговори, включва специфични хистопатологични и поведенчески процедури, които биха могли допълнително да бъдат подпомогнати чрез електрофизиологични и/или биохимични изследвания (1)(2)(3)(4).

Невротоксикантите могат да въздействат върху броя на елементите в рамките на нервната система и чрез разнообразни механизми. Тъй като невротоксичният потенциал на всички вещества може да бъде оценен чрез провеждането на неголям брой изследвания, може да се наложи да се използват други *in vivo* или *in vitro* изследвания, които са специфични за вида наблюдавана или очаквана невротоксичност.

Този метод за изследване може също да бъде използван във връзка с насоката, посочена в Ръководството на ОИСР за стратегии и методи за изследване на невротоксичността (1) за планиране на изследванията, които се провеждат, за да се охарактеризира в бъдещето или да се повиши чувствителността при последователното количествено определяне доза—отговор, или за по-доброто оценяване на нивото, при което не се наблюдава вреден ефект, или за потвърждаване на известните или допусканите опасни свойства на химикала. Например изследванията може да имат за цел идентифицирането и оценяването на невротоксичния(ите) механизъм(и) или допълването на вече известна данни, получени при използването на основните невроповеденчески и невропатологични процедури за наблюдения. Не е нужно да се повтарят такива изследвания, данните от които могат да бъдат събрани при прилагане на стандартните процедури, препоръчвани в този метод, ако тези данни са вече налични и ако това не се счита за необходимо при интерпретиране на резултатите от изследването.

Това невротоксикологично изследване, когато се използва самостоятелно или в комбинация, осигурява информация, която:

— позволява да се определи, дали нервната система е постоянно или обратимо повлияна от изпитвания химикал;

— допринася за охарактеризирането на измененията в нервната система, свързани с експозицията на химикала и за разбиране на основния механизъм;

▼B

— позволява да се определи връзката между дозата, времето и отговора, за да се оцени нивото, при което не се наблюдават вредни ефекти (което може да бъде използвано за установяване на критериите за безопасност за химикала).

При този метод за изследване изпитваното вещество се въвежда перорално. Възможно е други пътища на постъпване (напр. дермален или инхалаторен) да бъдат по-подходящи, и е възможно да бъде изискано модифициране на препоръчаните процедури. Изборът на път на постъпване се съобразява, в зависимост от профила на експозицията на човека и наличната токсикологична или кинетична информация.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Вреден ефект: е всяко свързано с третирането изменение спрямо първоначалното състояние, в резултат на което се повлиява на жизнеспособността на организма, неговата репродуктивност или способността му да се адаптира към условията на околната среда.

Доза: е количеството прието изпитвано вещество. Дозата се изразява като маса (g, mg) или като маса на изпитваното вещество за единица тегло на изследваното животно (напр. mg/kg), или като постоянни хранителни концентрации (ppm).

Дозирание: е общия период, свързан с дозата, честотата на прием и продължителността на дозиране.

Невротоксичност: е вредно изменение в структурата или функционирането на нервната система, в резултат от експозиция с химичен, биологичен или физичен агент.

Невротоксикант: е химичен, биологичен или физичен агент, способен да причини невротоксичност.

NOAEL: е абривиатурата на ниво, при което не се наблюдава вреден (неблагоприятен) ефект и представлява най-високото ниво на дозата, при която не се наблюдават находки (неблагоприятни промени), свързани с вредно въздействие.

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Изпитваният химикал се приема по орален път на постъпване в обхвата на дози, приемани от няколко групи лабораторни гризачи. Нормално се прилагат повтарящи се дози и режимът на дозиране може да бъде 28 дни, субхроничен (90 дни) или хроничен (1 година или по-дълъг период). Процедурата, представена в този метод, също може да бъде използвана за изследване на остра невротоксичност. Животните се изследват, за да се открият или да се охарактеризират поведенческите и/или неврологичните аномалии. Обхватът, в който може да бъде предизвикана реакция при въздействие от страна на невротоксикантите, се оценява през всеки един период на наблюдение. В края на експеримента подгрупа от животните от всеки пол, във всяка група, се перфузират *in situ* и секторите на главния мозък, гръбначния мозък и периферните нерви се подготвят и изпитват.

Когато изследването се провежда като самостоятелно изследване за проучване на невротоксичността или за охарактеризиране на невротоксичните ефекти, животните във всяка група, която не се използва за перфузия и последваща хистопатология (вижте таблица 1), могат да бъдат използвани за провеждане на определени невроповеденчески, невропатологични, неврохимични или електрофизиологични процедури, които могат да допълнят данните, получени при стандартните експерименти, чието провеждане се изисква от този метод (1). Тези допълнителни процедури могат да бъдат особено полезни, когато има емпирични наблюдения или се очакват ефекти, индикиращи за специфичен вид или група невротоксичност, предизвикана от химикала. Алтернативно, останалите животни могат да бъдат използвани за други оценки, такива като тези, посочени в методите за изпитване чрез токсикологични изследвания с повтарящи се дози при плъхове.

▼B

Когато процедурите на този метод за изследване се комбинират с тези на други методи за изследване, е необходимо да има достатъчен брой животни, за да се удовлетворят изискванията за наблюдения и на двете изследвания.

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ**1.4.1. Избор на животински видове**

Предпочитаният вид от групата на гризачите е плъх, въпреки че след обосноваване, и други видове гризачи могат да бъдат използвани. Обикновено при лабораторните опити се използват млади възрастни здрави животни. Женските индивиди трябва да не са раждали и да не са бременни. Дозирането нормално трябва да започне, колкото е възможно по-скоро след отбиването им, но за предпочитане, не по-късно от периода, когато животните са на шест седмици, и преди животните да станат на възраст девет седмици. Обаче, когато това изследване се комбинира с други изследвания, това възрастово изискване се нуждае от обосноваване. В началото на изследването вариациите в теглото на използваните животни трябва да не надвишават $\pm 20\%$ от средното тегло за всеки пол. Когато се провежда, за кратък период от време, изследване с повтаряща се доза като предшествашо дългосрочно изследване, и при двете изследвания трябва да бъдат използвани животни от една и съща порода и от един и същ вид.

1.4.2. Условия за отглеждане и хранене

Температурата в стаята на опитните животни трябва да бъде 22°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$). Въпреки че относителната влажност трябва да бъде поне 30% и е препоръчително тя да не надвишава 70% в друг момент, освен при почистване на стаята, трябва да се цели да се постигне $50\text{--}60\%$ относителна влажност. Светлината трябва да бъде изкуствена, с последващи 12 часа светъл период, 12 часа тъмен период. Като минимум трябва да се не се вдига рязък и силен шум. За хранене могат да бъдат използвани конвенционалните лабораторни диети с неограничен достъп до питейна вода. Изборът на диета може да бъде повлиян от нуждата да се осигури подходящо смесване на изпитваното вещество след приемането му по този метод. Животните могат да бъдат настанени в клетките индивидуално или на малки групи от един и същ пол.

1.4.3. Подготовка на животните

Здрави, млади животни са произволно отделени в контролни групи и групи, на които ще се въздейства. Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че възможните ефекти, в резултат на местоположението на клетката, да бъдат сведени до минимум. Животните индивидуално се идентифицират и се оставят в клетките си поне (5) пет дни преди започване на изследването, за да се аклиматизират към лабораторните условия.

1.4.4. Път на администриране и подготовка на дозите

При този метод за изследване конкретно се използва орален път на постъпване на изпитваното вещество. Оралният прием може да бъде осъществен чрез принудително хранене, посредством диета, чрез питейната вода или чрез капсули. Други пътища на администриране (напр. кожен или инхалаторен път на постъпване) също могат да бъдат използвани, но може да се изиска модифициране на препоръчаните процедури. Изборът на подходящия път на постъпване се съобразява в зависимост от профила на експозицията на човека и наличната токсикологична или кинетична информация. Трябва да се посочат съображенията за избора на съответния път на постъпване, както и резултатите от модификациите на процедурите на този метод за изпитване.

▼B

Когато е необходимо, изпитваното вещество може да бъде разтворено в подходящ разтворител. Препоръчва се да бъде обмислена първо възможността за използване на воден разтвор/суспензия, после — възможността за използване на разтвор/суспензия в масло (напр. царевично масло) и едва след това — възможността за използване на разтвор/суспензия в други разтворители. Трябва да бъдат известни токсичните характеристики на разтворителя. В допълнение, трябва да бъдат дадени следните характеристики на разтворителя: влияние на разтворителя върху абсорбцията, разпределението, метаболизма или задържането на изпитваното вещество, което може да промени токсичните си характеристики; и ефектите върху консумирането на храна или вода, или хранителното/питателното състояние на животните.

1.5. ПРОЦЕДУРИ

1.5.1. Брой и пол на животните

Когато изследването се провежда като самостоятелно изследване, трябва да бъдат използвани поне 20 животни (10 от женски пол и 10 от мъжки пол) за всяка доза и контролна група при оценяването на подробните клинични и функционални наблюдения. Най-малко пет животни от мъжки пол и пет животни от женски пол трябва да бъдат подложени на перфузия *in situ* и използвани за снемане на подробна неврохистопатология в края на изследването. В случаите, при които се наблюдава за признаци на невротоксични ефекти само група от ограничен брой животни, при дадена доза, трябва да бъде обърнато внимание на включването на тези животни в онези групи, избрани за перфузия. Когато изследването се провежда в комбинация с изследване за токсичност с повтарящи се дози, трябва да бъдат използвани подходящ брой животни, за да се постигнат целите и на двете изследвания. Минималният брой животни в група при различните комбинации от изследвания са представени в таблица 1. Ако се планира убиване или наблюдение на обратимостта, продължаването или забавеното появяване на токсични ефекти след третирането при възстановяващи се групи или когато се отчитат допълнителни наблюдения, тогава броят на животните трябва да бъде увеличен, за да бъде сигурно, че необходимият брой животни за наблюдения и хистопатология е в наличност.

1.5.2. Третиранни и контролни групи

Обикновено се използват групи, третирани с най-малко три дози и контролна група, но ако от оценката на други данни се установи, че не трябва да се очакват ефекти при повтаряща се доза от 1 000 mg/kg телесно тегло/ден, може да бъде проведено ограничено изследване. Ако няма подходящи налични данни, може да бъде проведено изследване за намиране на обхвата, с което да се подпомогне определянето на дозите, които ще бъдат използвани. С изключение на третиране с изпитваното вещество, животните в контролната група трябва да бъдат отглеждани по идентичен начин на този, при животните от третираната група. Ако се използва разтворител при администриране на изпитваното вещество, контролната група трябва да приеме количество, равняващо се на най-високия използван обем на разтворителя.

1.5.3. Проверка за достоверност

Лабораторията, провеждаща изследването, трябва да представи данни, удостоверяващи способността ѝ да извърши изследването и чувствителността на използваната процедура. Тези данни трябва да осигуряват доказателство за способността за откриване и количествено определяне, където е подходящо, на промените в различните крайни точки, препоръчвани за наблюдение, такива като автономни признаци, сензорни реакции, силно схващане на крайниците и двигателна активност. Информация за химикалите, които причиняват различни видове невротоксични отговори и които могат да бъдат използвани като вещества за позитивен контрол, може да бъде намерена в препратки от 2 до 9. Могат да бъдат използвани исторически данни, ако съществените аспекти на експерименталните процедури остават едни и същи. Препоръчва се периодично актуализиране на историческите данни. Трябва да бъдат получени нови данни, демонстриращи непрекъснатата/непроменената чувствителност на процедурите, когато някои важни елементи при провеждането на изследването или процедурите, са били променени от изпитващата лаборатория.

▼B

- 1.5.4. **Избор на доза**
 Нивата на дозите трябва да бъдат избрани като се вземат предвид всякакви предварително налични данни за наблюдаваните токсичност и кинетика при изпитваното съединение или свързани с него материали. Нивото на най-високата доза трябва да бъде избрано с цел да се предизвикат невротоксични ефекти или ясни системни токсични ефекти. Следователно намаляващата поредица от нива на дозите трябва да бъде избрана с оглед на получаване на някакъв, предизвикан от дозата, отговор и липсата на наблюдаван вреден ефект (NOAEL) при най-ниското ниво на дозата. По принцип нивата на дозите трябва да бъдат определени така, че началните токсични ефекти върху нервната система да могат да бъдат разграничени от ефектите, свързани със засягащата целия организъм токсичност. Два до три интервала често са достатъчни (оптимум) и добавянето на четвърта група за изпитване често е за предпочитане при използването на много големи интервали (напр. повече от фактор 10) между дозите. Където е възможно, трябва да се има предвид, че трябва да се направи разумна (приемлива) оценка на експозицията върху хората.
- 1.5.5. **Гранично изследване**
 Ако изследването при еднократно ниво на доза от най-малко 1 000 mg/kg телесно тегло/ден, което използва описаната процедура, не предизвиква видими невротоксични ефекти и ако не би трябвало да се очаква токсичност, въз основа на данни от структурно свързани (структурноподобни) съединения, тогава може да не е необходимо провеждането на пълното изследване, използващо три нива на дозите. Очакваната експозиция върху хората може да индикира необходимостта при ограниченото изследване да бъде използвано по-високо ниво на дозиране чрез орален прием. При други пътища на администриране, такива като инхалация или дермално прилагане, често физико-химичните свойства на изпитваното вещество може да наложат максималното достижимо ниво на експозицията. За провеждането на изследване за остра орална токсичност дозата за ограничено изследване трябва да бъде поне 2 000 mg/kg.
- 1.5.6. **Прием на дозите**
 Животните се дозират с изпитваното вещество ежедневно, в продължение на седем дни, всяка седмица, за период най-малко от 28 дни; използването на петдневен режим на дозиране или на по-кратък период на експозиция, е необходимо да бъде обосновано. Когато изпитваното вещество се приема чрез принудително хранене, това трябва да се прави с еднократна доза, посредством стомашна тръба или подходяща интубационна канюла. Максималният обем течност, който може да бъде администриран на един прием, зависи от размера на изследваното животно. Обемът не трябва да надвишава 1 ml/100 g телесно тегло. В случай на водни разтвори, обаче, може да бъде обмислена евентуалното използване на количество до 2 ml/100 g телесно тегло. С изключение на дразнещи или корозивни вещества, които обикновено показват изострени дразнещи ефекти при по-високи концентрации, варирането (променливостта) в изпитвания обем трябва да бъде минимизирано чрез регулиране на концентрацията, за осигуряване на постоянен обем при всички нива на дозите.
- За вещества, приемани чрез диетата или питейната вода, е важно да се удостовери, че включените в тях количества на изпитваното вещество, не оказват влияние върху нормалното хранене или водния баланс. Когато изпитваното вещество се приема в диетата, могат да бъдат използвани постоянната диетична концентрация (ppm) или постоянно ниво на дозата спрямо телесното тегло на животното; трябва да бъде определена и алтернатива за използване. За вещество, администрирано чрез принудително хранене, дозата трябва да бъде давана по подобни начини ежедневно, и регулирана при необходимост за поддържане или постоянно ниво на дозата спрямо телесното тегло на животното. Когато се използва изследване с повтаряща се доза като предшествашо (предварително) дългосрочно изследване, и при двете изследвания трябва да бъде използвана подобна диета. При изследване за остра токсичност, ако не е възможно еднократно дозиране, дозата може да бъде давана на малки порции (фракции, части) в продължение на период, който не надвишава 24 часа.

▼B

1.6. НАБЛЮДЕНИЯ

1.6.1. Честота на наблюденията и изследванията

При изследвания с повтарящи се дози, периодът на наблюдения трябва да покрива периода на дозиране. При изследване за остра токсичност трябва да се извършат наблюдения в 14-дневния период след третирането. При животни от сателитните (съпътстващите) групи, които не са подложени на експозиция през периода след третирането, наблюденията трябва да покриват същия този период.

Наблюденията трябва да бъдат правени достатъчно често, за да се увеличат в максимална степен вероятността за откриване на всякакви поведенчески и/или неврологични аномалии. За предпочитане е наблюденията да бъдат правени по едно и също време всеки ден, като се обърне внимание на максималния период за очаквани ефекти след дозирането. Честотата на клиничните наблюдения и функционалните изследвания е резюмирана в таблица 2. Ако кинетични или други данни, събрани от предишни изследвания, показват необходимост от използване на различни времеви моменти за наблюдения, изследвания или периодите след наблюдение, трябва да бъде приет алтернативен график, за да се получи в максимална степен информация. Трябва да се обмисли и обосновка на промените в графика.

1.6.1.1. *Наблюдения върху общото здравословно състояние и смъртност/заболеваемост*

Всички животни трябва да бъдат внимателно наблюдавани най-малко веднъж на ден, във връзка с тяхното здравословно състояние, както и най-малко два пъти дневно, в случай на заболяване или смърт.

1.6.1.2. *Подробни клинични наблюдения*

Подробни клинични наблюдения трябва да бъдат правени върху всички, избрани за тази цел, животни (вижте таблица 1), веднъж преди първата експозиция (за да са възможни сравнения в тази връзка) и на различни интервали от време след това, в зависимост от продължителността на изследването (вижте таблица 2). Подробни клинични наблюдения върху сателитни (съпътстващи) възстановяващи се групи трябва да бъдат направени в края на възстановителния период. Подробните клинични наблюдения трябва да бъдат направени извън домашната клетка на стандартна арена. Те трябва внимателно да бъдат записани чрез използване на голям брой системи, които включват критерии или голям брой мащаби за всяко измерване при наблюденията. Използваните критерии или мащаби трябва да бъдат ясно (категорично) определени от изпитвателната лаборатория. Трябва да бъде направено усилие да се осигури минимално вариране в условията за изследване (несистематично свързани с третирането) и тези наблюдения да се провеждат от обучени наблюдатели, които не са запознати с действителното третиране.

Препоръчва се наблюденията да бъдат провеждани по структуриран начин, в който систематично се прилагат добре дефинирани критерии (включително определението на понятието „обхват“) при всяко животно за всяко време на наблюдение. „Нормалният обхват“ трябва да бъде адекватно документиран. Всички наблюдавани признаци трябва да бъдат записани. Когато е възможно, големината (размерът) на наблюдаваните признаци също трябва да бъде записана. Клиничните наблюдения трябва да включват, но без да се ограничават до, изменения в кожа, козина, очи, лигавици, поява на секрета и екскреция и автономна дейност (напр. лакримация, пилоерекция, размер на зениците, необичайни респираторни модели и/или дишане през устата, всякакви необичайни признаци на уриниране и дефекация, и обезцветена урина).

▼ B

Всякакви необичайни отговори, свързани с положение на тялото, ниво на активност (напр. понижено или повишено проучване на стандартна арена) и координация на движенията трябва да бъдат отбелязани. Промените в походката (напр. клатушкаща се „патешка“ походка, атаксия), позата (напр., претърбване) и реактивността при отглеждане, поведение или други стимули на околната среда, както и наличието на клонични или тонични (ободряващи) движения, конвулсии или тремори, стереотипи (напр. прекомерно чесане, необичайни движения на главата, серийни (стандартни) цикли) или странно поведение (напр. хапане или прекомерно облизване, самоосакатяване, вървеж в обратна посока (на заден ход), издаване на двущи) или агресивност трябва да бъдат записани.

1.6.1.3. *Функционални изследвания*

По подобие на подробните клинични наблюдения, функционалните изследвания също трябва да бъдат проведени веднъж преди експозицията и често след това при всички, избрани за тази цел, животни (вижте таблица 1). Честотата на функционалното изследване също зависи от продължителността на експеримента (вижте таблица 2). В допълнение към периодите на наблюдение, посочени в таблица 2, трябва да бъдат направени функционални наблюдения върху сателитните възстановяващи се групи, колкото е възможно по-близо, до момента на убиването при завършване на изследването. Функционалните изследвания трябва да включват сензорна реактивност към стимули от различен вид (модалност) [напр. слухови, визуални и рецепторни стимули (5)(6)(7)], оценка на силата на схващане на крайниците (8) и оценка на двигателната активност (9). Двигателната активност трябва да бъде измерена с автоматичен уред, способен да улови и пониженията, и повишенията в активността. Ако се използва друга определена система, тя трябва да бъде количествено определена и нейната чувствителност и надеждност трябва да бъде демонстрирана. Всеки уред трябва да бъде проверен, за да се осигури надеждност през време на и при съвместимост между уредите. Повече подробности за процедурите, които трябва да бъдат следвани, са дадени в съответните препратки. Ако няма данни (напр. структура — активност, епидемиологични данни, други токсикологични изследвания), които да индикират потенциалните невротоксични ефекти, трябва да бъде обмислено включването на по-специализирани изследвания на сензорната и двигателната функция или научаване и запаметяване, за по-подробно изследване на тези възможни ефекти. Повече информация за по-специализираните изследвания и тяхното използване е представена в (1).

По изключение, животните, които проявяват признаци на токсичност в степен, която значително би повлияла на функционалното изследване, могат да бъдат извадени от това изследване. Трябва да бъде представено обяснение (да се обоснове) елиминирането на животните от функционалното изследване.

1.6.2. **Телесно тегло и консумация на храна/вода**

При изследвания с продължителност до 90 дни, всички животни трябва да бъдат претегляни поне веднъж на седмица и трябва да бъдат правени най-малко ежеседмични измервания на консумацията на храна (консумацията на вода, когато изпитваното вещество се администрира чрез такава среда). При дългосрочни изследвания, всички животни трябва да бъдат претегляни поне веднъж седмично, в продължение на първите 13 седмици и най-малко веднъж на всеки четири седмици след това. Трябва да бъдат правени измервания и на консумацията на храна (консумацията на вода, когато изпитваното вещество се администрира чрез такава среда) поне веднъж седмично, в продължение на първите 13 седмици и след това на приблизителни тримесечни интервали, освен ако промени в здравословното състояние или в телесното тегло не налагат нещо друго.

▼ **B**1.6.3. **Офталмология**

При изследвания, по-дълги от 28 дни, офталмологичното изследване, използващо офталмоскоп или подходящ еквивалентен инструмент, следва да бъде проведено преди администрирането на изпитваното вещество и при завършване на изследването, за предпочитане при всички животни или поне при животните, при които се прилага високата доза, и при тези от контролните групи. Ако се открият изменения в очите или ако клинични признаци покажат такава необходимост, всички животни следва да бъдат изследвани. При дългосрочни (продължителни) изследвания офталмологичното изследване следва също да бъде провеждано в продължение на 13 седмици. Не е необходимо провеждането на офталмологични изследвания, ако вече има такива данни от други изследвания с подобна продължителност и при подобни нива на дозите.

1.6.4. **Хематология и клинична биохимия**

Когато невротоксичното изследване се провежда в комбинация със систематично токсикологично изследване с повтарящи се дози, следва да бъдат проведени хематологични изследвания и клиничните биохимични определяния, както е посочено в съответния метод за систематично токсикологично изследване. Изборът на образци следва да бъде направен по такъв начин, че всякакви потенциални ефекти за неврологичното поведение да са минимизирани.

1.6.5. **Хистопатология**

Невропатологичното изследване е предназначено за допълване и разширяване на наблюденията, правени по време на *in vivo* фазата на изследването. Тъкани от поне 5 животни/пол/група (вж. таблица 1 и следващия параграф) следва да бъдат фиксирани *in situ*, чрез използване на общопознати перфузионни и фиксиращи техники (вж. препратка 3, глава 5 и препратка 4, глава 50). Всички наблюдавани цялостни промени следва да бъдат записани. Когато изследването се провежда като самостоятелно изследване за скрининг за невротоксичност или за охарактеризиране на невротоксичните ефекти, останалите части от животните могат да бъдат използвани и за специфични невроповеденчески (10)(11), невропатологични (10)(11)(12)(13), неврохимични (10)(11)(14)(15) или електрофизиологични (10)(11)(16)(17) процедури, които могат да подпомогнат процедурите и изследванията, описани тук, или да повишат броя на изследваните обекти от хистопатологията. Тези спомагателни процедури са от особено значение, когато емпирични наблюдения или очаквани ефекти индиректно за специфичен вид или група невротоксичност (2)(3). Алтернативно, останалите части от животните могат също да бъдат използвани за рутинни патологични оценки, както е описано в метода за изследвания с повтаряща се доза.

Следва да бъде изпълнена цялостно оцветяваща процедура, такава като хематоксилин и еозин (H&E), върху всички тъкани екземпляри (проби), поставени в парафин, и следва да бъде проведено микроскопско изследване. Ако се допускат или се наблюдават признаци на периферна невропатия, следва да бъдат изследвани пластично поставени проби от периферна нервна тъкан. Клиничните признаци също могат да предложат допълнителни места за изследване или използване на специални оцветяващи процедури. Насока за определянето на допълнителни места, които да бъдат изследвани, може да бъде намерена в (3)(4). Специални подходящи оцветители за демонстриране на определени видове патологични промени могат също да бъдат от полза (18).

▼B

Хистологично следва да бъдат изследвани представителни сектори (части) от централната и периферната нервна система (вж. препратка 3, глава 5 и препратка 4, глава 50). Изследваните зони обикновено включват: предния мозък, центъра на главния мозък, включително сектора през хипокампуса, средния мозък, малкия мозък, продълговатия мозък, окото с оптичния нерв и ретината, лимфния възел при цервикален и лумбарен оток (подутина), гръбначните коренови ганглии, гръбначните и коремните коренови влакна (нишки), разположения близо до средата на тялото седалищен нерв, разположения близо до средата на тялото тибиялен нерв (при коляното) и мускулните разклонения при тибиялния нерв на прасеца. Секторите от лимфния възел и периферните нерви следва да включват едновременно кръстосани или напречни и надлъжни сектори. Следва да бъде обърнато внимание на васкулатурата на нервната система. Проба от скелетен мускул, особено мускула на прасеца, следва също да бъде изследвана. Специално внимание следва да бъде отделено на местата с клетъчна и нишковидна структура и известните модели в CNS и PNS, които ще бъдат особено повлияни от невротоксикантите.

Насока за невропатологичните алтернативи, които обикновено произтичат от експозиция на токсичен агент, може да бъде намерена в препратки (3)(4). Препоръчва се да се проведе поетапно изследване на тъканни проби, при което сектори от групата, дозирана с висока доза, първо се сравняват с тези от контролната група. Ако не се наблюдават невропатологични изменения в пробите от тези групи, не се изискват следващи анализи. Ако се наблюдават невропатологични изменения в групата с по-висока доза, следва да бъде взета проба от всяка от потенциално повлияните тъкани от групите със средна и ниска доза и впоследствие да бъдат кодирани и изследвани.

Ако бъде открито някакво доказателство за невропатологични изменения при количественото определяне, тогава следва да бъде проведено второ изследване за всички области от нервната система, показващи такива изменения. Сектори от всички дозирани групи от всяка от потенциално повлияните области следва да бъдат кодирани и изследвани произволно, без да е известен кодът. Честотата и тежестта на всяко поражение следва да бъдат записани. След като бъдат оценени всички области от всички дозирани групи, кодът може да бъде разкрит и да бъде проведен статистически анализ за оценяване на зависимостта доза—отговор. Следва да бъдат описани примери за различните степени на тежест при всяко поражение.

Невропатологичните находки следва да бъдат оценени в контекста на наблюденията и измерванията върху поведението, както и от други данни от предишни и паралелни изследвания за токсичността за целия организъм от изпитваното вещество.

2. ДАННИ

2.1. ОБРАБОТВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Следва да бъдат осигурени индивидуални данни. В допълнение, всички данни следва да бъдат резюмирани в таблична форма, която да показва при всяко изследване или контролна група броя на животните в началото на изследването, броя на животните, намерени мъртви по време на изследването или убити по хуманни съображения, броя на появилите се признаци на токсичност, описание на наблюдаваните признаци на токсичност, включително време на появата им, продължителност, вид и тежест на всеки от токсичните ефекти, броя на животните, показващи поражения, включително вид и тежест на поражението(ята).

▼B**2.2. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Находките от изследването следва да бъдат оценени по отношение на разпространение, тежест и корелация на невроповеденчески и невропатологични ефекти (неврохимични или електрофизиологични ефекти, както и ако са били включени допълнителни изследвания) и на всички други наблюдавани вредни ефекти. Когато е възможно, следва да се оценят получените числени резултати чрез използване на подходящ и общоприет статистически метод. Статистическите методи следва да бъдат избрани при планирането (проектирането) на изследването.

3. ОТЧИТАНЕ**3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитвано вещество:

- физична природа (включително изомеризация, чистота и физикохимични свойства);
- данни за идентичността.

Разтворител (ако има такъв):

- обосноваване на избора на разтворител, ако е различен от вода.

Изследвани животни:

- използвани видове/породи;
- брой, възраст и пол на животните;
- водоизточник, условия за отглеждане, аклиматизация, диета и т.н.;
- индивидуално тегло на животните в началото на изследването.

Условия на изследването:

- подробности за формулирането на изпитваното вещество/приготвянето на диетата, постигната концентрация, стабилност и хомогенност на препарата;
- определяне на администрираните дози, включително подробности за разтворителя, обема и физичната форма на приемания материал;
- подробности за администрирането на изпитваното вещество;
- обосноваване на избраните нива на дозата;
- обосноваване на пътя на постъпване и продължителността на експозицията;
- конверсия от диета/питейна вода с концентрация на изпитваното вещество (ppm) към активна доза (mg/kg телесно тегло/ден), ако е приложимо;
- подробности за качеството на храната и водата.

Наблюдения и процедури за изследване:

- подробности за отнасянето на животните от всяка група към перфузионните подгрупи;
- подробности за точковите системи за оценяване, включително критерии и точкови мащаби за всяко измерване при подробните клинични наблюдения;

▼B

- подробности за функционалните изследвания на сензорната реактивност за стимулиране на различни модалности (напр. слухови, визуални и рецепторни); за оценка на издръжливостта при контролиране на крайниците; за оценка на двигателната активност (включително подробности за автоматизираните устройства за определяне на активността); и други използвани процедури;
- подробности от офталмологичните изследвания и, където е подходящо, хематологичните изследвания и клиничните биохимични изследвания със съответните стойности на базовата линия;
- подробности за специфичните невроповеденчески, невропатологични, неврохимични или електрофизиологични процедури.

Резултати:

- телесно тегло/промени в телесното тегло, включително на телесното тегло при убиването;
- консумация на храна и консумация на вода, където е подходящо;
- данни за токсичен отговор по пол и ниво на дозата, включително признаци на токсичност или смърт;
- вид, острота и продължителност (начално време и следващ курс) на подробните клинични наблюдения (дали са обратими или не);
- подробно описание на всички функционални резултати от изследването;
- находки при аутопсията;
- подробно описание на всички невроповеденчески, невропатологични и неврохимични или електрофизиологични находки, ако има такива;
- данни за абсорбцията и метаболизма, ако има такива;
- статистическа обработка на резултатите, ако е подходящо.

Обсъждане на резултатите;

- информация за дозата, при която има отговор;
- връзка на някои други токсични ефекти със заключението за невротоксичния потенциал на изпитваното вещество;
- ниво, при което не се наблюдава вреден ефект.

Заключения:

- препоръчва се да се представи специфично изявление относно цялостната невротоксикология на изпитваното вещество.

4.

ПРЕПРАТКИ

- (1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.
- (2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.
- (3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.
- (4) Spencer, P. S. and Schaumburg, H. H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P. S. and Schaumburg, H. H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

- (5) Tupper, D.E. and Wallace, R. B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999—1003.
- (6) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, 691—704.
- (7) Moser, V. C., McDaniel, K. M. and Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. *Toxic. Appl. Pharmacol.*, 108, 267—283.
- (8) Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C. and Riley, M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233—236.
- (9) Crofton, K. M., Haward, J. L., Moser, V. C., Gill, M. W., Reirer, L. W., Tilson, H. A. and MacPhail, R. C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, 599—609.
- (10) Tilson, H. A., and Mitchell, C. L. eds. (1992). *Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series*. Raven Press, New York.
- (11) Chang, L. W., ed. (1995). *Principles of Neurotoxicology*. Marcel Dekker, New York.
- (12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, 10, 689—695.
- (13) Moser, V. C., Anthony, D. C., Sette, W. F. and MacPhail, R. C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, 18, 343—352.
- (14) O'Callaghan, J. P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. *Eurotoxicol. Teratol.*, 10, 445—452.
- (15) O'Callaghan J.P. and Miller, D. B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244, 368—378.
- (16) Fox, D. A., Lowndes, H. E. and Birkamper, G. G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: *Nervous System Toxicology*. Mitchell, C. L. ed. Raven Press, New York, pp 299—335.
- (17) Johnson, B. L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Spencer, P. S. and Schaumburg, H. H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726—742.
- (18) Bancroft, J. D. and Steven A. (1990). Theory and Practice of Histological Techniques. Chapter 17, *Neuropathological Techniques*. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.



Таблица 1

Минимален брой животни в група, когато невротоксикологично изследване се провежда отделно или комбинирано с други изследвания

	НЕВРОТОКСИКОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ, ПРОВЕДЕНО КАТО:			
	отделно изследване	комбинирано изследване с 28-дневно изследване	комбинирано изследване с 90-дневно изследване	комбинирано изследване с изследване за хронична токсичност
Общ брой животни в група	10 мъжки и 10 женски	10 мъжки и 10 женски	15 мъжки и 15 женски	25 мъжки и 25 женски
Брой на животните, избрани за функционално изследване, включващо подробни клинични наблюдения	10 мъжки и 10 женски	10 мъжки и 10 женски	10 мъжки и 10 женски	10 мъжки и 10 женски
Брой на животните, избрани за перфузия <i>in situ</i> и за неврохистопатология	5 мъжки и 5 женски	5 мъжки и 5 женски	5 мъжки и 5 женски	5 мъжки и 5 женски
Брой на животните, избрани за наблюдения при повтарящи се дози/субхронична/хронична токсичност, хематология, клинична биохимия, хистопатология и други, както е указано в съответните <i>ръководства</i>		5 мъжки и 5 женски	10 мъжки † и 10 женски †	20 мъжки † и 20 женски †
Допълнителни наблюдения, където е подходящо	5 мъжки и 5 женски			

† Включва пет животни, избрани за функционални изследвания и подробни клинични наблюдения като част от невротоксичното изследване.



Таблица 2

Честота на клиничните наблюдения и функционалните изследвания

Вид наблюдения		Продължителност на изследването			
		остро	28-дневно	90-дневно	хронично
При всички животни	Общо здравословно състояние	Ежедневно	Ежедневно	Ежедневно	Ежедневно
	Смъртност/заболеваемост	Два пъти дневно	Два пъти дневно	Два пъти дневно	Два пъти дневно
При животни, избрани за функционални наблюдения	Подробни клинични наблюдения	— преди първата експозиция — през 8 часа от дозиране при оценяването време за слаб ефект — на 7-ия и 14-ия ден след дозирането	— преди първата експозиция — след това веднъж седмично	— преди първата експозиция — веднъж по време на първата или втората седмица от експозицията — ежемесечно след това	— преди първата експозиция — веднъж в края на първия месец от експозицията — на всеки три месеца след това
	Функционални изследвания	— преди първата експозиция — през 8 часа от дозиране при оценяването време за слаб ефект — на 7-ия и 14-ия ден след дозирането	— преди първата експозиция — през четвъртата седмица на третиране, колкото се може по-близо до края на периода на експозицията	— преди първата експозиция — веднъж по време на първата или втората седмица от експозицията — ежемесечно след това	— преди първата експозиция — в края на първия месец от експозицията — на всеки три месеца след това



Б.44. КОЖНА АБСОРБЦИЯ: *IN VIVO* МЕТОД

1. МЕТОД

Този метод на изпитване е еквивалентен на OECD TG 427 (2004).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Излагането на много от химичните вещества става предимно *през* кожата, докато по-голямата част от токсикологичните изследвания, направени върху лабораторни животни, използват оралния път на прилагане. Изследването за перкутанна абсорбция *in vivo*, описано в тези насоки, осигурява връзката, необходима за екстраполиране на орални изследвания, при правенето на оценки за безопасност след кожно излагане.

Едно вещество следва да премине през голям брой слоеве на кожата, преди да достигне до обращението. Слойт, който определя степента на преминаване за повечето вещества, е *stratum corneum*, състоящ се от мъртви клетки. Проницаемостта през кожата зависи както от липофилността на веществото, така и от дебелината на външния слой на епидермиса, наред с фактори като молекулно тегло и концентрация на веществото. Като цяло, кожата на плъховете и зайците е по-проницаема, отколкото тази на хората, докато проницаемостта на кожата на морските свинчета и маймуните е по-сходна с човешката.

Методите на измерване на перкутанна абсорбция могат да се разделят на две категории: *in vivo* и *in vitro*. Методът *in vivo* може да осигурява добра информация в различни видове лабораторни животни за кожната абсорбция. Неотдавна бяха разработени методите *in vitro*. Те използват транспорта през напълно или частично дебела животинска или човешка кожа до резервоар с флуид. Методът *in vitro* е описан като отделен метод на изпитване (1). Препоръчва се да се направи консултация с документа за насоки на OECD за провеждане на изследвания за кожна абсорбция (2), за да се подпомогне изборът на най-подходящ метод при всеки отделен случай, тъй като той дава повече подробности за това, кога е подходящ методът *in vivo* и кога — методът *in vitro*.

Методът *in vivo*, който се описва в този метод, позволява определянето на проникването на изпитваното вещество през кожата във вътрешните органи. Техниката е широко използвана от много години насам (3)(4)(5)(6)(7). Въпреки че изследванията *in vitro* на перкутанна абсорбция могат в много случаи да са подходящи, може да има случаи, в които единствено изследване *in vivo* може да осигури необходимите данни.

Предимствата на метода *in vivo* са, че той използва физиологично и метаболитно незасегната система, използва видове, които се използват за много от изследванията за токсичност, и може да се модифицира за прилагане при други видове. Недостатъците са използването на живи животни, нуждата от радиоактивно белязан материал, за да се подпомогне получаването на надеждни резултати, трудности при определяне на ранната фаза на абсорбция и разликите в проницаемостта на предпочетения вид (плъх) и човешката кожа. Животинската кожа като цяло е по-проницаема и поради това човешката перкутанна абсорбция може да се надцени (6)(8)(9). Каустици/корозивни вещества не бива да се тестват върху живи животни.

▼B

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Неабсорбирана доза: представлява дозата, измита от кожната повърхност след излагане, и всяка доза, която е налице върху неоклузивната превръзка, включително всяка доза, за която бъде доказано, че се е изпарила от кожата по време на излагане.

Абсорбирана доза (*in vivo*): състои се от дозата, налична в урината, от измиване на клетката, изпражненията, издишания въздух (ако е измерен), кръвта, тъканите (ако са събирани) и останалия труп след отстраняване на кожата от мястото на прилагане.

Абсорбируема доза: представлява дозата, която е останала по или в кожата след измиване.

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

Изпитваното вещество, за предпочитане е то да е радиоактивно белязано, се нанася върху остриганата кожа на животните при едно или повече подходящи нива на дозиране, под формата на представителен препарат за употреба. Изпитваният препарат се оставя в контакт с кожата за определен период от време под подходяща превръзка (неоклузивна, полуоклузивна или оклузивна), за да се предотврати поглъщането на изпитвания препарат от животното. В края на времето за излагане превръзката се отстранява, кожата се почиства с подходящ измиващ агент, като превръзката и измиващите материали се запазват за анализ, и се поставя нова превръзка. Животните се отглеждат преди, по време и след периода на излагане в индивидуални метаболитни клетки, като екскретите и издишания въздух през тези периоди се събират за анализ. Събирането на издишания въздух може да се пропусне, когато има достатъчно информация, че не се образува почти никакъв или никакъв летлив радиоактивен метаболит. Всяко изследване обикновено включва няколко групи животни, които се излагат на препарата за изпитване. Една група ще бъде убита в края на периода на излагане. Другите групи ще бъдат убити след това на определени интервали от време (2). В края на периода, определен за взимане на проби, се убиват останалите животни, взима се кръв за анализ, мястото на прилагане се отстранява за анализ, а трупът се анализира за неекскретиран материал. Пробите се изпитват със съответните методи и се установява степента на перкутанна абсорбция (6) (8) (9).

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.4.1. Избор на животинския вид

Плъхът е най-често използваният вид, но могат да се използват и породите без козина или тези, които имат степен на кожна абсорбция, сходна с тази при хората (3) (6) (7) (8) (9). Следва да се използват млади, зрели и здрави животни от един и същи пол (като по подразбиране се използва мъжкият пол) на широко използвани лабораторни породи. В началото на изследването разликите в теглото на използваните животни не трябва да надвишават $\pm 20\%$ от средното тегло. За пример, подходящи са мъжки плъхове с тегло 200—250 g, особено в горната част на тези граници.

▼B**1.4.2. Брой и пол на животните**

За всеки препарат на изпитване и за всяка предварително определена продължителност следва да се използва група от поне четири животни от един и същи пол. Всяка група животни ще бъде убита след различен интервал от време, например в края на периода на експониране (обикновено от 6 до 24 часа) и последващи случаи (например 48 и 72 часа). Ако има данни, показващи съществени разлики в дермалната токсичност между женски и мъжки, следва да се избере почувствителният пол. Ако няма такива данни, може да се използва който и да е пол.

1.4.3. Условия на отглеждане и хранене

Температурата в експерименталното помещение с животните трябва да бъде 22 °C (± 3 °C). Въпреки че относителната влажност трябва да е поне 30 % и за предпочитане да не превишава 70 %, освен по време на почистване на помещението, целта следва да е 50—60 %. Осветлението трябва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. За хранене могат да се използват конвенционалните лабораторни храни, които да бъдат напълно достъпни заедно с неограничено количество питейна вода. По време на изследването и за предпочитане също по време на аклиматизацията животните трябва да се държат поединично в метаболитни клетки. Тъй като разпръсването на храна и вода би компроментирало резултатите, възможността това да се случи трябва да бъде сведена до минимум.

1.4.4. Подготовка на животните

Животните се бележат, за могат да бъдат индивидуално идентифицирани, и се държат в клетките си за период поне от пет дни преди началото на изследването, за да могат да се аклиматизират към лабораторните условия.

След периода на аклиматизация и приблизително 24 часа преди прилагането на изпитваното вещество, участък от гърба в областта на раменете на всяко животно се остригва до кожа. Свойствата на проникване на увредена кожа са различни от тези на неувредена кожа и трябва да се положат грижи да се избегне нараняване на кожата. След остригването и приблизително 24 часа преди изпитваното вещество да се нанесе върху кожата (вж. също точка 1.4.7), кожната повърхност трябва да се избърше с ацетон, за да се отстрани себумът. Не се препоръчва допълнително измиване със сапун и вода, тъй като останалият сапун може да насърчи абсорбцията на изпитваното вещество. Площта трябва да бъде достатъчно голяма, за да позволи надеждно изчисляване на абсорбираното количество изпитвано вещество на квадратен сантиметър кожа, за предпочитане поне 10 cm². Тази площ се постига при плъхове с телесно тегло 200—250 g. След подготовката животните се връщат в метаболитните клетки.

1.4.5. Изпитвано вещество

Изпитваното вещество е продуктът, чиито свойства на проникване трябва да се изследват. В идеалния случай изпитваното вещество трябва да бъде радиоактивно белязано.

1.4.6. Препарат за изпитване

Препаратът с изпитваното вещество (напр. чист, разтворен или приготвен по формула материал, съдържащ изпитваното вещество, който се прилага върху кожата) трябва да бъде същият (или реалистичен заместител) като този, на който могат да бъдат изложени хора или други прицелни видове. Всякакво отклонение от препаратата за употреба трябва да бъде оправдано. Когато е необходимо, изпитваното вещество е в разтвор или в суспензия в подходяща среда. За среди, различни от водата, трябва да са познати характеристиките на абсорбция и потенциалното взаимодействие с изпитваното вещество.

▼B**1.4.7. Прилагане върху кожата**

Определя се мястото на прилагане с определена площ върху кожната повърхност. Върху мястото равномерно се нанася предварително определено количество от изпитвания препарат. Това количество би трябвало да отговаря на потенциално човешко излагане, обикновено 1—5 mg/cm² за твърди вещества или до 10 µl/cm² за течности. Всякакви други количества трябва да бъдат оправдани с очакваните условия на използване, целите на изследването или физичните характеристики на изпитвания препарат. След прилагането третираното място трябва да се предпази от търкане. Пример за такова типично приспособление е показан на фигура 1. Обикновено мястото на прилагане се предпазва чрез неоклузивна превръзка (например пропусклив компрес от найлонова марля). Обаче при безкрайно дълго прилагане мястото на прилагане трябва да бъде направено оклузивно. В случай че изпаряването на полуетливи изпитвани вещества намалява стелента на събиране на изпитваното вещество до неприемливи стойности (вж. също точка 1.4.10, първа алинея), е необходимо изпареното вещество да се улови във въглен филтър, който покрива приспособлението на прилагане (вж. фигура 1). Важно е никое приспособление да не уврежда кожата, нито пък да реагира със или да абсорбира изпитвания препарат. Животните се връщат в единични метаболитни клетки, за да се събере екскретът им.

1.4.8. Продължителност на експозиция и вземане на проби

Продължителността на излагане е интервалът от време между прилагането и отстраняването на изпитвания препарат от кожата чрез измиване. Трябва да се използва подходящ период на излагане (обикновено от 6 до 24 часа), който да се основава на очакваната продължителност на излагане на хора. След периода на експозиция животните се гледат в метаболитните клетки до планирания край. Животните следва редовно да се наблюдават за признаци на токсичност/анормални реакции на равни интервали през цялото време на изследването. В края на излагането третираната кожа трябва да се прегледа за видими признаци на раздразнение.

Метаболитните клетки трябва да позволяват отделното събиране на урина и изпражнения по време на цялото изследване. Те трябва да позволяват също и събирането на ¹⁴C-въглероден двуокис и летливите ¹⁴C-въглеродни съединения, които следва да се анализират, ако се произвеждат в големи количества (> 5 %). Урината, изпражненията и уловените флуиди (като ¹⁴C-въглероден двуокис и ¹⁴C-въглеродни съединения) трябва да бъдат събирани индивидуално от всяка група във времето за вземане на проби. Ако има достатъчно информация, че се е образувало слабо летливо или нелетливо радиоактивно метаболитно вещество, може да се използват отворени клетки.

Екскретите се събират по време на периода на експозиция, до 24 часа след първоначалния контакт с кожата и след това ежедневно до края на експеримента. Обикновено е достатъчно събирането на екскрети на три интервала, но предвиданото предназначение на изпитвания препарат или съществуващи данни за кинетиката може да изискват по-подходящи или допълнителни точки във времето, които да бъдат изследвани.

В края на периода на излагане защитното приспособление се отстранява от всяко животно и се запазва поотделно за анализ. Третираната кожа на всички животни трябва да се измие поне 3 пъти с измиващ агент, като се използват подходящи тампони. Трябва да се внимава да не се замърсят други части на тялото. Измиващият агент трябва да е представител на нормалната хигиенна практика, напр. сапунена вода. Накрая кожата трябва да се подсуши. Всички тампони и други средства за почистване трябва да се запазят за анализ. Трябва да се сложи нова превръзка, за да се защити третираното място на онези животни, които образуват по-късни групи, преди да се завърнат в индивидуалните клетки.

▼ B1.4.9. **Крайни процедури**

За всяка група индивидуалните животни се убиват в определеното време и се взима кръв за изследване. Защитното приспособление или превръзка се сваля за анализ. От всяко животно кожата от мястото на прилагане и подобна площ нетретрирана остригана кожа се отстраняват за отделен анализ. Мястото на прилагане може да се фрагментира, за да се отдели *stratum corneum* от лежащия под него епидермис и да се осигури повече информация за разположението на изпитваното вещество. Определянето на това разположение за даден период след периода на излагане трябва да даде някаква индикация за съдбата в *stratum corneum* на което и да е вещество на изпитване. За да се улесни разделянето на фракции (след окончателното измиване на кожата и убиването на животното), се сваля всяко защитно средство. Кожата на мястото на прилагане, заедно с пръстен кожа около него, се изрязва от плъх и се забобжда върху равна повърхност. Върху кожата с леко натискане се прилага парче лепенка и след това се отстранява заедно с част от *stratum corneum*. Това се повтаря с още парчета лепенка, докато лепенката престане да се залепва върху повърхността на кожата и *stratum corneum* е отстранен напълно. За всяко животно всички парчета лепенка могат да се поставят в един контейнер, в който се добавя разтворител на тъкани, за да разтвори *stratum corneum*. Всяка потенциална целева тъкан може да бъде отстранена за отделно измерване, преди остатъчният труп да се анализира за абсорбираната доза в трупа. Труповете на отделните животни трябва да се запазят за анализ. Обикновено е достатъчен анализът на общото съдържание. Органите обект на внимание могат да се отстранят за отделен анализ (ако това е показано от други изследвания). Урината, която се намира в пикочния мехур в момента на планираното убиване, трябва да се добави към събраната преди това урина. След събирането на екскрети от метаболитните клетки в момента на убиването, клетките и вратичките им трябва да се измият с подходящ разтворител. Друго евентуално замърсено оборудване също трябва да се анализира.

1.4.10. **Анализ**

При всички изследвания трябва да се постигне адекватно събиране (т.е. средно $100 \pm 10\%$ от радиоактивността). Събирането извън този обхват трябва да бъде обосновано. Количеството на приложената доза за всяка проба трябва да се анализира с помощта на подходящи валидирани процедури.

Статистическият анализ трябва да включва измерване на отклонението на повторните изпитвания за всяко прилагане.

2. **ДАННИ**

Следните измервания трябва да бъдат направени за всяко животно в момента на всяко вземане на проба за изпитваното вещество и/или метаболити. В допълнение към индивидуалните данни, данните, групирани според времето на вземане на проби, трябва да се докладват като средни стойности.

— количество, свързано със защитните средства;

— количество, което може да се събере от кожата;

— количество във/по кожата, което не може да се измие от нея;

▼B

- количество в кръвната проба;
- количество в екскрета и издишания въздух (ако има такива);
- количество, оставащо в трупа и в органите, отстранени за отделен анализ.

Количеството изпитвано вещество и/или метаболити в екскрета, издишания въздух, кръвта и трупа ще позволят да бъде определено общото количество, абсорбирано във всяка точка от времето. Може да се направи и изчисление на количеството изпитвано вещество, абсорбирано на квадратен сантиметър кожа, изложена на изпитваното вещество по време на периода на излагане.

3. ДОКЛАДВАНЕ

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Докладът от изпитването трябва да съдържа изискванията, определени в протокола, включително обосновка за използваната система на изпитване, и трябва да се включва следното:

Изпитвано вещество:

- идентификационни данни (например CAS-номер, ако има; източник; чистота (радиохимична чистота); известни примеси; номер на партида),
- физична природа, физикохимични свойства (например рН, летливост, разтворимост, стабилност, молекулно тегло и $\log P_{ow}$).

Препарат за изпитване:

- формула и обосновка на употребата;
- подробности за препарата за изпитване, приложено количество, достигната концентрация, транспортна среда, стабилност и хомогенност.

Лабораторно животно:

- използван вид/порода,
- брой, възраст и пол на животните,
- източник на животните, условия на живот, хранене и т.н.,
- индивидуално тегло на животните в началото на теста.

Условия на теста:

- подробности на администрирането на препарата на изпитване (място на прилагане, методи на изпитване, оклузия/без оклузия, обем, екстракция, откриване);
- подробности за качеството на храната и водата.

Резултати:

- всякакви признаци на токсичност,
- таблично представени данни за абсорбцията (изразени като степен, количество или процент),

▼B

— всичко обратно събрано от експеримента,

— тълкуване на резултатите, сравнение с други налични данни за перкутанна абсорбция на изпитваното съединение.

Обсъждане на резултатите.

Изводи.

4.

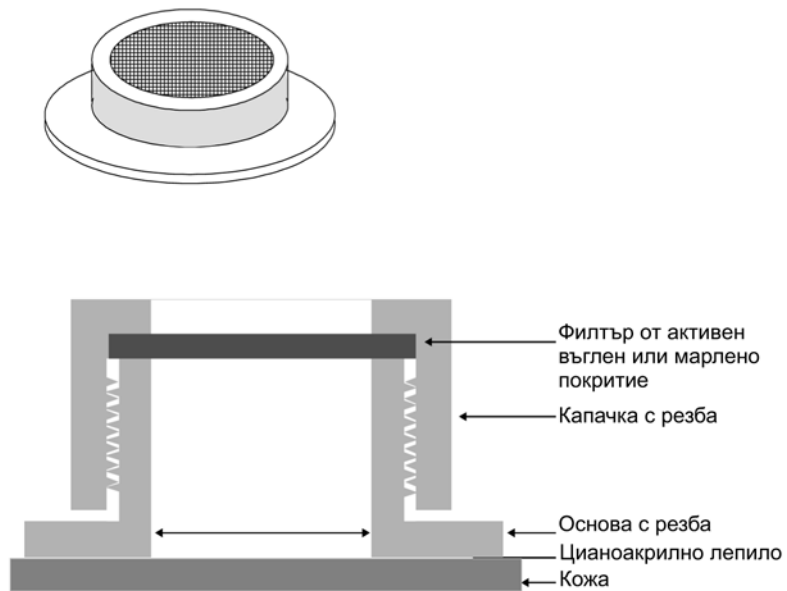
ПРЕПРАТКИ

- (1) Testing Method B.45. Skin Absorption: *In vitro* Method.
- (2) (2) ОИСП, 2002. Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
- (3) ECETOC, 1993. Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.
- (4) Zendzian R. P., 1989. Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829—835.
- (5) Kemppainen B. W., Reifenrath W. G., 1990. Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.
- (6) EPA, 1992. Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.
- (7) EPA, 1998. Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.
- (8) Bronaugh R. L., Wester R. C., Bucks D., Maibach H. I. and Sarason R. (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in rhesus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369—373.
- (9) Feldman R. J. and Maibach H. I., 1970. Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399—404.

▼B

Фигура 1

Пример за класическо средство, използвано за отделяне и предпазване на мястото на кожно прилагане при изследвания *in vivo* на перкутанната абсорбция





Б.45. КОЖНА АБСОРБЦИЯ: *IN VITRO* МЕТОД

1. МЕТОД

Този метод на изпитване е еквивалентен на ОИСП TG 428 (2004).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Този метод е разработен, за да се получи информация за абсорбцията на изпитваното вещество, приложено върху изрязана кожа. Той може или да се комбинира с метода за кожна абсорбция: метод *in vivo* (1), или да се прилага самостоятелно. Препоръчва се да се направи консултация с Ръководството за провеждане на изследвания за кожна абсорбция на ОИСП (2), за да може да се подпомогне създаването на изследвания, основани на този метод. Ръководството е изготвено, за да се улесни изборът на подходящия метод *in vitro* за използване при конкретните обстоятелства и да се обезпечи надеждност на резултатите, получени с помощта на този метод.

Методите за измерване на кожната абсорбция и преминаването през кожата могат да се разделят на две категории: *in vivo* и *in vitro*. Методите *in vivo* за кожна абсорбция са добре установени и осигуряват фармакокинетична информация за голям брой животински видове. Методът *in vivo* е описан отделно в друг метод на изпитване (1). Методите *in vitro* също се използват отдавна за измерване на кожната абсорбция. Въпреки че не са правени официални валидиращи изследвания на методите *in vitro*, обхванати от този метод на изпитване, експертите от ОИСП се съгласиха през 1999 г., че има достатъчно данни, на които е направена оценка и които са в подкрепа на метода *in vitro* (3). Повече подробности, които подкрепят това, включително значителен брой преки сравнения на методи *in vivo* и *in vitro*, са дадени в ръководството (2). Съществуват голям брой монографии, които разглеждат тази тема и дават подробна информация за използването на *in vitro* метод (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). Методите *in vitro* измерват дифузията на химикалите вътре и през кожата към резервоар с флуид и могат да използват нежизнеспособна кожа за измерване само на дифузията, или свежа, метаболитно активна кожа за едновременното измерване на дифузията и кожния метаболизъм. Подобни методи имат приложение особено като средство за сравнение на усвояването на веществата при различни формули на приготвяне, във и през кожата, и също могат да осигурят полезни модели за оценка на перкутанната абсорбция при хората.

Методът *in vitro* не може да се прилага за всички ситуации и химични класове. Може да се използва методът за изпитване *in vitro* за първоначална качествена оценка на кожно проникване. В някои случаи може да се наложи то да бъде последвано от данни, получени *in vivo*. Трябва да се направи справка с ръководството (2) за по-нататъшно разработване на случаи, при които *in vitro* методът би бил подходящ. Допълнителна подробна информация, за да се подпомогне вземането на решение, е дадена в препратка (3).

Този метод показва общите принципи за измерване на дермалната абсорбция и преминаване на изпитваното вещество, като се използва изрязана кожа. Може да се използва кожа на различни видове бозайници, включително и хора. Свойствата на проникваемост на кожата се запазват и след изрязването от тялото, тъй като основната бариера пред дифузията е неживият *stratum corneum*; активен транспорт на химични вещества през кожата не е наблюдаван. Доказано е, че кожата има способността да метаболизира някои химикали по време на перкутанна абсорбция (6), но този процес не ограничава степента по отношение на действително абсорбираната доза, макар да може да повлияе на природата на материала, който прониква в кръвообращението.

▼B

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Неабсорбирана доза: представлява дозата, измита от повърхността на кожата след излагане, и всяка друга доза, която е налице върху неоклузивната превръзка, включително всяка доза, за която може да се покаже, че се е изпарила от кожата по време на излагането.

Абсорбирана доза (*in vitro*): количеството изпитвано вещество, достигнало до рецепторния флуид или до циркулацията в системата в рамките на определен период от време.

Абсорбируема доза (*in vitro*): представлява дозата, която е налице върху или в кожата след измиване.

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

Изпитваното вещество, което може да бъде радиоактивно белязано, се прилага върху повърхността на кожната проба, която разделя двете камери на дифузионната клетка. Веществото остава върху кожата за определено време при определени условия, преди да бъде отстранено с помощта на подходяща процедура за измиване. От рецепторния флуид се взимат проби в определени моменти по време на експеримента и се анализират за изпитваното вещество и/или метаболити.

Когато се използват метаболитноактивни системи, метаболитите на изпитваното вещество могат да се анализират с помощта на подходящи методи. В края на експеримента се правят количествени измервания на разпределението на изпитваното вещество и метаболитите, когато това е необходимо.

Като се използват подходящи условия, които са описани в този метод и в ръководството (2), абсорбцията на изпитваното вещество по време на определен период се измерва чрез анализ на рецепторния флуид и третираната кожа. Изпитваното вещество, останало в кожата, трябва да се счита за абсорбирано, освен ако може да бъде показано, че абсорбцията може да се определя само със стойностите в рецепторния флуид. Анализът на другите компоненти (материала, измит от кожата, и останалия вътре в кожните слоеве) позволява по-нататъшна оценка на данните, включително общото отлагане на изпитваното вещество и процента на събиране.

За да се покаже функционирането и надеждността на системата за изпитване, лабораторията, в която се провежда изпитването, трябва да разполага с резултати за съответните референтни вещества, които да съответстват на публикуваната литература за използвания метод. Това изискване може да се изпълни, като се изпита подходящо референтно вещество (за предпочитане такова с липофилност, близка до тази на изпитваното вещество) едновременно с изпитваното вещество или като се осигурят подходящи исторически данни за ред референтни вещества с различна липофилност (например кофеин, бензоена киселина, тестостерон).

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

1.4.1. Дифузна клетка

Дифузната клетка се състои от донорна камера и рецепторна камера, между които е разположена кожата (пример на типична концепция е даден на фигура 1). Клетката трябва да осигурява добро „запечатване“ около кожата, да дава възможност за лесно вземане на проби и добро смесване на рецепторния разтвор в контакт с долната страна на кожата, както и добър температурен контрол на клетката и нейното съдържание. Може да се използват както статични, така и проточни дифузни клетки. Обикновено донорните камери се оставят неоклузивни по време на излагане на определена крайна доза от изпитвания препарат. Обаче при безкрайни приложения и някои сценарии с крайни дози донорните камери може да бъдат оклузивни.

▼B**1.4.2. Рецепторен флуид**

За предпочитане е да се използва физиологично съвместим рецепторен флуид, въпреки че могат да се използват и други, при условие че това се обоснове. Трябва да има описание на точния състав на рецепторния флуид. Трябва да се покаже необходимата разтворимост на изпитваното вещество в рецепторния флуид, така че той да не действа като бариера за абсорбцията. Освен това рецепторният флуид не бива да уврежда целостта на изпитваната кожа. При проточна система стойността на потока не трябва да пречатства дифузията на изпитваното вещество в рецепторния флуид. При система със статична клетка флуидът трябва непрекъснато да се разбърква и редовно да се взимат проби. Ако се изследва метаболизмът, рецепторният флуид трябва да поддържа кожната жизнеспособност по време на целия експеримент.

1.4.3. Подготвяне на кожата

Може да се използва кожа от човешки и животински източници. Отчита се фактът, че употребата на човешка кожа е предмет на национални и международни етични съображения и условия. Макар да се предпочита жизнеспособна кожа, нежизнеспособна също може да се използва, при условие че може да се покаже ненарушеността на кожата. Приемливо е използването както на епидермални мембрани (отделени ензимно, чрез нагряване или по химичен начин), така и на кожа с разцепена дебелина (типично с дебелина 200—400 µm), приготвени с дерматом. Може да бъде използвана кожа с цялата си дебелина, но следва да се избягва прекомерната дебелина (са. > 1 mm), освен ако нарочно не се изисква за определяне на изпитваното вещество в кожните слоеве. Избирането на животинския вид, анатомичното място и техниките за подготовка на препаратите следва да бъде аргументирано. Изискват се приемливи данни от минимум четири репликацията на изпитвано вещество.

1.4.4. Ненарушеност на подготвената кожа

От съществена важност е кожата да бъде правилно подготвена. Неправилното боравене може да доведе до увреждане на *stratum corneum* и затова следва да се провери ненарушеността на подготвената кожа. Когато се изследва кожният метаболизъм, прясно изрязаната кожа следва да се използва възможно най-скоро и при условия, за които е известно, че поддържат метаболитната активност. Като обща насока, прясно изрязаната кожа следва да се използва до 24 часа, но приемливият период на съхранение може да варира в зависимост от ензимната система, която участва в метаболизма, и от температурите на съхранение (13). Когато кожните препарати са били съхранявани преди употребата им, следва да се покаже, че бариерната им функция не е нарушена.

1.4.5. Изпитвано вещество

Изпитвано вещество е веществото, чиито характеристики на проникване следва да се изучат. В идеалния случай изпитваното вещество следва да бъде радиационно маркирано.

1.4.6. Изпитван препарат

Препаратът с изпитваното вещество (напр. чист, разтворен или приготвен по формула материал, съдържащ изпитваното вещество, който се прилага върху кожата) следва да бъде същият (или реалистичен заместител) като този, на който хора или други прицелни видове могат да бъдат изложени. Всякакво отклонение от препарата за употреба следва да бъде оправдано.

▼ B**1.4.7. Концентрации на изпитваните вещества и формули с тяхно участие**

Нормално се използва повече от една концентрация на изпитваното вещество, като се достигат горните граници на потенциалното излагане на човека. Също така следва да се предвиди изпитване на разпространени формули.

1.4.8. Прилагане върху кожата

При нормални условия излагането на човека на химични вещества обикновено е при крайни дози. Поради това следва да се използва прилагане, което копира човешко излагане, обикновено $1\text{--}5\text{ mg/cm}^2$ от кожата за твърдите вещества и до $10\text{ }\mu\text{l/cm}^2$ за течностите. Количеството следва да бъде обосновано с очакваните условия на употреба, целите на изследването или физичните характеристики на изпитвания препарат. Например прилаганията към кожната повърхност могат да бъдат непрекъснати, когато се прилагат големи количества на единица площ.

1.4.9. Температура

Пасивната дифузия на химичните вещества (и поради това тяхната абсорбция от кожата) се влияе от температурата. Дифузната камера и кожата следва да се поддържат с постоянна температура, близо до нормалната кожна температура от $32 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$. Различните концепции клетки изискват различни температури, постигнати във водна баня или с нагревателен блок, за да се гарантира, че рецепторът/кожата е във физиологичната си норма. Препоръчителната влажност е между 30 и 70 %.

1.4.10. Продължителност на излагането и вземане на проби

Излагането на кожата на изпитвания препарат може да продължи през целия експеримент или за по-кратки периоди от време (т.е. да копира конкретен тип човешко излагане). Кожата следва да се измие от излишния изпитван препарат с подходящ измиващ агент и течността от изплакването следва да се събере за анализ. Процедурата по отстраняване на изпитвания препарат зависи от очакваните условия на употреба и следва да бъде обоснована. Обикновено се изисква период от 24 часа за вземане на проби, за да се позволи адекватното характеризиране на абсорбционния профил. Тъй като кожната цялост може да започне да се влошава след 24-ия час, периодите на вземане на проби обикновено не следва да превишават 24 часа. За изпитвани вещества, които проникват бързо в кожата, може да не е необходимо, но за онези вещества, които проникват бавно, може да се изискват по-дълги периоди. Честотата на вземане на проби от рецепторния флуид би следвало да позволи абсорбционният профил на изпитваното вещество да се представи графично.

1.4.11. Крайни процедури

Всички компоненти на системата за изпитване следва да се анализират и да се определи събираемостта. Това включва донорната камера, течността от изплакването на кожната повърхност, кожата за изпитване и рецепторния флуид/камера. В някои случаи за отделно анализиране кожата може да се раздели на изложена кожна област, кожна област под фланеца на клетката и на фракциите на *stratum corneum* — епидермис и дермис.

1.4.12. Анализ

Във всички проучвания следва да се постигне адекватно събиране (целта следва да бъде средно $100 \pm 10\%$ от радиоактивността и всяко отклонение следва да се обоснове). Количеството изпитвано вещество в рецепторния флуид, кожата на изпитване, отпадъците при измиване на кожната повърхност и течността от изплакването на апарата следва да се анализират с помощта на подходящи техники.

▼B2. **ДАНИИ**

Трябва да бъде направен анализ на рецепторния флуид, разпределението на изпитваното вещество в системата за изпитване и абсорбционния профил във времето. Когато се прилагат условия с крайна доза на излагане, следва да се изчислят количеството, измито от кожата, количеството, свързано с кожата (и в различните слоеве на кожата, ако е анализирано), и наличното количество в рецепторния флуид (степен и количество или процент от приложената доза). Кожната абсорбция понякога може да се опише само с данните от рецепторния флуид. Въпреки това, когато остане изпитвано вещество в кожата в края на проучването, то може да се наложи да се включи в общото абсорбирано количество (вж. параграф 6б в препратка 3). Когато се използват условия с безкрайна доза на излагане, данните могат да позволят да се изчисли константата на проникваемост (K_p). При такива условия процентът на абсорбиране не е приложим.

3. **ДОКЛАДВАНЕ**3.1. **ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Протоколът от изпитването следва да съдържа изискванията, описани в протокола, включително и обосновка за използваната система на изпитване, и следва да се състои от следното:

Изпитвано вещество:

- физична природа, физикохимични свойства (поне молекулно тегло и $\log P_{ow}$), чистота (радиохимична чистота);
- идентификационна информация (например номер на партида);
- разтворимост в рецепторния флуид.

Изпитван препарат:

- формула и основание за използване;
- хомогенност.

Условия на изпитване:

- източници и място на кожата, метод на подготовка, условия на съхранение преди употреба, някаква предварителна обработка (почистване, третиране с антибиотици и др.), измервания на ненарушеността на кожата, метаболитен статус, основание за употреба;
- вид клетка, състав на рецепторния флуид, количество на потока на рецепторния флуид или времена и процедури за вземане на пробите;
- подробности за прилагането на изпитвания препарат и количеството използвана доза;
- продължителност на експозиция;
- подробности за отстраняването на изпитвания препарат от кожата, напр. изплакване на кожата;
- подробности за анализа на кожата и техниките на раздробяване, използвани за показване на разпределението в кожата;

▼B

- процедури за миене на клетката и оборудването;
- методи на изпитание, техники на екстракция, граници на откриване и на валидиране на метода за анализ.

Резултати:

- цялостна събираемост от експеримента (приложена доза = материали от измиването на кожата + кожа + рецепторен флуид + материали от измиването на клетката);
- таблично представяне на събираното във всяко отделение на отделната клетка;
- абсорбционен профил;
- представяне в табличен вид на абсорбционните данни (изразени като съотношение, количество или процент).

Обсъждане на резултатите.

Изводи.

4. ПРЕПРАТКИ

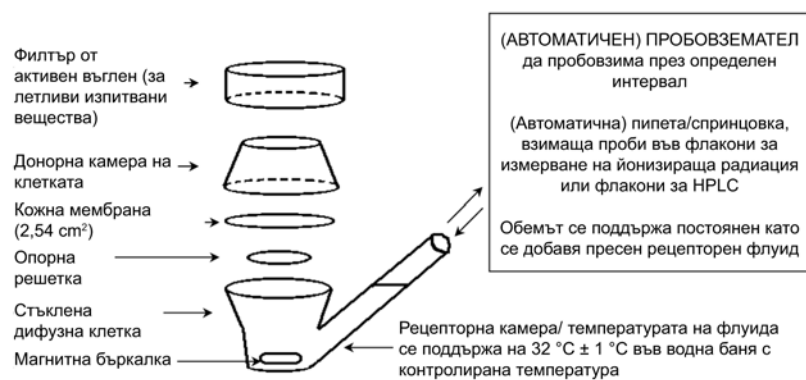
- (1) Testing Method B.44. Skin Absorption: *In vivo* Method.
- (2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
- (3) OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.
- (4) Kemppainen B. W. and Reifenrath W. G. (1990). Methods for skin absorption. CRC
- (5) Bronaugh R. L. and Collier, S. W. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*, R. L. Bronaugh and H.I. Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237—241.
- (6) Bronaugh R. L. and Maibach H. I. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.
- (7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.
- (8) Diembeck W., Beck H., Benech-Kieffer F., Courtellemont P., Dupuis J., Lovell W., Paye M., Spengler J., Steiling W. (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, *Fd Chem Tox*, 37, 191—205.
- (9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.
- (10) Howes D., Guy R., Hadgraft J, Heylings J. R. *et al.* (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

- (11) Schaefer H. and Redelmeier T. E. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.
- (12) Roberts M. S. and Walters K. A. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.
- (13) Jewell, C., Heylings, J. R., Clowes, H. M. and Williams, F. M. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356—365.

Фигура 1

Пример за типична конструкция на статична дифузна клетка за изследване *in vitro* на перкутанна абсорбция



▼ M3

**Б.46. IN VITRO КОЖНО ДРАЗНЕНЕ: МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ
ВЪРХУ РЕКОНСТРУИРАН ЧОВЕШКИ ЕПИДЕРМИС**

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Кожно дразнене означава предизвикване на обратимо увреждане на кожата вследствие на прилагането на изпитвано вещество за период от време до 4 часа [както е определено в Глобалната хармонизирана система за класифициране и етикетиране на химикали (GHS) на Организацията на обединените нации (ООН) и Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 г. относно класифицирането, етикетирането и опаковането на вещества и смеси (Регламент CLP) (1) (3)]. Настоящият метод за изпитване (МИ) съдържа *in vitro* процедура, която може да се използва за определянето на опасността от дразнещи химикали (вещества и смеси) в съответствие с категория 2 по GHS на ООН и Регламент CLP на ЕС (1) (2) (3). В ЕС и други региони, които не са приели незадължителната категория 3 по GHS на ООН (слаби дразнителни), настоящият МИ може също така да се използва за определяне на неклассифицирани химикали, т.е. без категория по GHS на ООН и Регламент CLP на ЕС (1) (3). Настоящият МИ може да се използва за определяне на дразнещия ефект на химикали върху кожата като напълно самостоятелно заместващо изпитване на *in vivo* изпитването за кожно дразнене в рамките на стратегия за поетапно изпитване (4) и глава Б.4 от настоящото приложение).
2. Оценката на кожното дразнене обикновено включва използването на опитни животни [Указание за изпитване 404 на ОИСП; глава Б.4 от настоящото приложение] (4). Метод Б.4 бе преработен през 2004 г. във връзка със съображенията за хуманно отношение към животните, което позволи определянето на корозивността/дразненето на кожата с прилагането на стратегия за поетапно изпитване, като се използват валидирани *in vitro* и *ex vivo* методи и по този начин се избягват болката и страданието на животните. Три валидирани метода за *in vitro* изпитване бяха приети като указания за изпитване 430, 431 и 435 на ОИСП (5) (6) (7) и два от тях като глави Б.40 и Б.40 bis от настоящото приложение, които следва да се използват за свързаната с корозивността част на стратегията за поетапно изпитване от метод Б.4 или Указание за изпитване 404 на ОИСП (4).
3. Предмет на настоящия МИ е кожното дразнене като опасност за човешкото здраве. Той се основава на реконструиран човешки епидермис (RhE), който поради цялостното си устройство (използването на човешки нетрансформирани епидермални кератиноцити като източник на клетки, както и на използването на представителна тъканна и клетъчна структура) силно наподобява биохимичните и физиологичните свойства на горните слоеве на човешката кожа, т.е. на епидермиса. Настоящият МИ също така включва набор от стандарти за ефективност (СЕ) (допълнение 2) за оценката на сходни и модифицирани методи за изпитване, основани на RhE и разработени от ЕС-ECVAM (8), в съответствие с принципите на Ръководство № 34 на ОИСП (9).
4. Съществуват три валидирани метода, които съответстват на разглеждания тук МИ. Бяха проведени изследвания преди валидирането, както и изследвания за оптимизирането и за валидирането на метод за *in vitro* изпитване (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), предлаган на пазара като EpiSkin™ и използващ модел на реконструиран човешки епидермис (RhE) (определен като валидирания референтен метод — ВРМ). Други два предлагани на пазара методи RhE за *in vitro* изпитване за кожно дразнене са показали подобни резултати като ВРМ съгласно валидиране, основано на стандартите за ефективност (21), и това са методите EpiDerm™ SIT (EPI-200) и SkinEthic™ RHE (22).

▼ M3

5. Преди предлаган сходен или модифициран метод RhE за *in vitro* изпитване, различен от BPM и методите EpiDerm™ SIT (EPI-200) или SkinEthic™ RHE, да може да бъде използван за регулаторни цели, следва да се определят неговата надеждност, приложимост (точност) и ограничения за предложеното му използване, за да се гарантира, че той може да се счита за сходен с BPM, в съответствие със стандартите за ефективност, определени в настоящия МИ (допълнение 2). Освен това е препоръчително да се направи справка в Обяснителния справочен документ на ОИСП относно *in vitro* изпитването за кожно дразнене, преди разработването и валидирането на сходен или модифициран метод RhE за *in vitro* изпитване и представянето му за регулаторно приемане (23).

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

6. Използваните определения са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

7. Едно ограничение на МИ, както бе демонстрирано чрез изследването за валидиране (16), се състои в това, че той не позволява класифицирането на химикали в незадължителната категория 3 по GHS на ООН (леки дразнителни) (1). Когато се използва като частично заместващо изпитване, може да се изиска последващо *in vivo* изпитване, за да се характеризира напълно потенциалът за кожно дразнене (4 и глава Б.4 от настоящото приложение). Признава се, че използването на човешка кожа е предмет на национални и международни етични съображения и условия.
8. Предмет на настоящия МИ е *in vitro* изпитването за кожно дразнене като елемент от стратегията за поетапно изпитване на Б.4 (Указание за изпитване 404 на ОИСП) относно корозивност/дразнене на кожата (4). Докато настоящият МИ не предоставя адекватна информация за корозивността на кожата, следва да се отбележи, че методът за изпитване Б.40 bis (Указание за изпитване 431 на ОИСП) относно корозивността на кожата се основа на една и съща система за изпитване RhE, макар че се използва друг протокол (глава Б.40 bis). Настоящият метод се основава на моделите RhE, използващи човешки кератиноцити, като по този начин представя *in vitro* целевия орган на вида, представляващ интерес. Освен това той обхваща пряко първоначалния етап от каскадата на възпалението/механизмът на действие на възпалението (увреждане на клетки и тъкани, водещо до локализирана травма), която/който се появява по време на *in vivo* дразнене. По време на валидирането, което е залегнало в основата на настоящия МИ, беше изпитан широк кръг от химикали, като емпиричната база данни на изследването за валидиране наброяваше общо 58 химикала (16) (18) (23). Методът е приложим за твърди вещества, течности, полутвърди вещества и восъци. Течностите може да са на водна или друга основа; твърдите вещества може да са разтворими или неразтворими във вода. Където е възможно, твърдите вещества преди използването им следва да бъдат стрити на фин прах, като не се изисква никаква друга предварителна обработка на пробата. Газовете и аерозолите все още не са оценени с валидационно проучване (24). Въпреки че е възможно те да бъдат изпитвани чрез използване на технология RhE, настоящият МИ не дава възможност за изпитване на газове и аерозоли. Освен това следва да се отбележи, че силно оцветените химикали могат да окажат влияние на измерванията за жизнеспособността на клетките и е необходимо използването на адаптирани контроли за корекции (вж точки 24—26).
9. Едно изпитване, включващо три тъканни репликата, би следвало да е достатъчно за изпитването на даден химикал, когато класификацията е недвусмислена. При все това при наличие на гранични резултати, каквито са несъответстващите измервания на репликати и/или средната жизнеспособност, изразена процентно като $50 \pm 5\%$, следва да се разгледа възможността за провеждане на второ изпитване, както и на трето изпитване в случай на наличие на несъответстващи резултати между първите две изпитвания.

▼ M3

ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

10. Изпитваният химикал се прилага локално на триизмерен модел на реконструиран човешки епидермис (RhE), състоящ се от нетрансформирани човешки епидермални кератиноцити, които са култивирани да образуват многослоен, силно диференциран модел на човешкия *епидермис*. Той се състои от организиран базален, спинозен и грануларен слой, и от многослоен *стратум корнеум*, съдържащ междуклетъчни ламелни липидни слоеве, представляващи основните липидни класове, аналогични на тези, които се наблюдават *in vivo*.
11. Кожното дразнене, предизвикано от химикали, което се проявява с еритема и оток, е резултат от поредица от събития, започваща с проникване в *роговия слой* и увреждане на по-долните слоеве кератиноцити. Умиращите кератиноцити освобождават медиатори, които дават начало на каскадата на възпалението, действаща върху клетките в дермиса, по-специално върху стромалните и ендотелиалните клетки. Разширяването и повишената пропускливост на ендотелиалните клетки водят до получаването на наблюдаваните еритема и оток (24). Основните на RhE методи измерват началните събития, настъпващи в рамките в каскадата.
12. Клетъчната жизнеспособност в моделите RhE се измерва чрез ензимно превръщане на виталния оцветител МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид, тиазолил синьо; CAS номер 298-93-1] в синя формазамова сол, която се измерва количествено след екстракция от тъканите (25). Дразнещите химикали се определят по способността им да намаляват клетъчната жизнеспособност под определени прагови нива (т.е. $\leq 50\%$ за дразнител от категория 2 по GHS на ООН/Регламент CLP на ЕС). В зависимост от регулаторната рамка, в която се използват резултатите от настоящия МИ, химикалите, при които клетъчната жизнеспособност е над определеното прагово ниво, могат да се считат за химикали, които не са дразнител (т.е. $> 50\%$, „Без категория“).

ДОКАЗВАНЕ НА КОМПЕТЕНТНОСТ

13. Преди рутинното използване на който и да било от трите валидирани метода, които се придържат към настоящия МИ, лабораториите следва да докажат техническа компетентност, като използват десетте референтни химикала, посочени в таблица 1. По отношение на сходни методи, разработени съгласно настоящия МИ, или изменения на някой от трите валидирани метода, следва да бъдат спазени изискванията на стандартите за ефективност, описани в допълнение 2 от настоящия МИ, преди методът да бъде използван за регулаторно изпитване.
14. Като част от процедурата за доказване на компетентност, е препоръчително след получаването на тъканите ползвателят да провери бариерните им свойства, както е посочено от производителя на модела на RhE. Това е особено важно, ако тъканите са били превозвани на дълго разстояние или в продължение на дълги периоди от време. След като един метод е успешно установен и е доказана компетентност по отношение на неговото използване, такава проверка няма да бъде рутинно необходима. Когато обаче методът се използва рутинно, се препоръчва да се продължи оценяването на бариерните свойства на редовни интервали.

Таблица 1

Референтни химикали (1)

Химикал	CAS №	Балова оценка <i>in vivo</i> (2)	Агрегатно състояние	Категория по GHS на ООН/ Регламент CLP на ЕС
Нафтилоцетна киселина	86-87-3	0	Твърдо	Без категория
Изопропанол	67-63-0	0,3	Течно	Без категория

▼ M3

Химикал	CAS №	Балова оценка <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Агрегатно състояние	Категория по GHS на ООН/ Регламент CLP на ЕС
Метилов стеарат	112-61-8	1	Твърдо	Без категория
Хептил бутират	5870-93-9	1,7	Течно	Без категория (Незадължителна категория 3) ⁽³⁾ ⁽⁴⁾
Хексил салицилат	6259-76-3	2	Течно	Без категория (Незадължителна категория 3) ⁽³⁾ ⁽⁴⁾
Цикламен алдехид	103-95-7	2,3	Течно	Категория 2
1-бромхексан	111-25-1	2,7	Течно	Категория 2
Калиев хидроксид (5 % воден разтвор)	1310-58-3	3	Течно	Категория 2
1-метил-3-фенил-1-пиперазин	5271-27-2	3,3	Твърдо	Категория 2
Хептанал	111-71-7	3,4	Течно	Категория 2

⁽¹⁾ Тези референтни химикали са подгрупа на референтните химикали, използвани при изследването за валидиране.

⁽²⁾ Балова оценка *in vivo* в съответствие с Б.4 и Указание за изпитване 404 на ОИСП (4).

⁽³⁾ Съгласно настоящия метод за изпитване, незадължителната категория 3 по GHS на ООН (слаби дразнителни) се счита за „Без категория“.

⁽⁴⁾ Незадължителната категория 3 по GHS на ООН не е приложима съгласно Регламент CLP на ЕС.

ПРОЦЕДУРА

15. По-долу са описани елементите и процедурите на метод RhE за оценка на кожно дразнене. Следва да бъде реконструиран модел на RhE, като той може да бъде изготвен на място или закупен от търговски източник. Налични са стандартни работни процедури (СРП) за методите EpiSkinTM, EpiDermTM SIT (EPI-200) и SkinEthicTM RHE (26) (27) (28). Изпитването следва да се провежда съгласно следните изисквания:

Елементи на метода за изпитване RhE

Общи условия

16. За реконструирането на епитела следва да се използват нетрансформирани човешки кератиноцити. Под функционалния *рогов слой* следва да има множество слоеве от жизнеспособни епителни клетки (*базален, спинозен и грануларен слой*). *Роговият слой* следва да бъде многослоен и да съдържа основния липиден профил, за да създаде функционална бариера, която е достатъчно здрава, за да устои на бързото проникване на цитотоксични химични маркери, например натриев додецил сулфат (SDS) или Triton X-100. Барьерната функция следва да бъде доказана и може да бъде оценена или чрез определяне на концентрацията, при която химичен маркер намалява жизнеспособността на тъканите с 50 % (IC₅₀) след определено време на експозиция, или чрез определяне на времето на експозиция, необходимо за намаляване на жизнеспособността с 50 % (ET₅₀) при прилагане на химичния маркер с определена фиксирана концентрация. Задържащите свойства на модела на RhE следва да предотвратяват преминаването на материал около *роговия слой* към жизнеспособната тъкан, което би довело до неадекватно моделиране на експозицията на кожата. Моделът на RhE следва да не е заразен с бактерии, вируси, микоплазма или гъбички.

▼ **M3***Функционални условия*

Жизнеспособност

17. Използваното изпитване за определяне на величината на жизнеспособността е изпитването с МТТ (25). Ползвателите на модела на RhE следва да гарантират, че всяка използвана партида от модела на RhE отговаря на определените критерии за отрицателната контрола (ОК). Оптичната плътност (ОП) на разтворителя, който се използва за екстракцията, сама по себе си следва да бъде достатъчно малка, т.е. $ОП < 0.1$. Разработчикът/доставчикът на модела на RhE определя интервал на приемливост (горна и долна граница) за стойностите на ОП на отрицателната контрола (при условията на метода за изпитване за кожно дразнене), като интервалите на приемливост за трите валидирани метода са дадени в таблица 2. Следва да се документира, че тъканите, третирани с ОК, са стабилни като култура (дават сходни измервания на жизнеспособността) за периода на продължителност на експозицията при изпитването.

Таблица 2

Интервали на приемливост за стойностите на ОП на отрицателната контрола

	Долна граница на приемливост	Горна граница на приемливост
EpiSkin™ (SM)	$\geq 0,6$	$\leq 1,5$
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	$\geq 1,0$	$\leq 2,5$
SkinEthic™ RHE	$\geq 1,2$	$\leq 2,5$

Барьерна функция

18. *Роговият слой* и липидният му състав следва да бъдат достатъчни, за да устоят на бързото проникване на цитотоксични химични маркери, например SDS или Triton X-100, оценено с IC_{50} или ET_{50} (таблица 3).

Морфология

19. Следва да бъде проведено хистологично изследване на модела на RhE, за да се докаже структура, подобна на човешки *епидермис* (включително на многослойния *рогов слой*).

Възпроизводимост

20. Резултатите от положителните контролни химикали (ПК) и отрицателните контроли (ОК) на метода за изпитване следва да доказват възпроизводимост с течение на времето.

Контрол на качеството (КК)

21. Разработчикът/доставчикът на модела на RhE следва да гарантира и докаже, че всяка използвана партида от модела на RhE отговаря на определени критерии за пускане в обращение на продукцията, сред които най-значими са тези за *жизнеспособността* (точка 17), *барьерната функция* (точка 18) и *морфологията* (точка 19). Тези данни следва да бъдат предоставени на ползвателите на метода, така че те да могат да включат тази информация в протокола от изпитването. Разработчикът/доставчикът на модела на RhE (или изследователят, ако се използва собствен модел) следва да определи интервал на приемливост (горна и долна граница) за IC_{50} или ET_{50} . За надеждно прогнозиране на класификацията на дразненето могат да се приемат само резултати, получени с отговарящи на изискванията тъкани. Интервалите на приемливост за трите валидирани метода са дадени като пример в таблица 3.

▼ M3

Таблица 3

Примери за критерии на контрол на качеството на партида за пускане в обращение

	Долна граница на приемливост	Горна граница на приемливост
EpiSkin™ (SM) (18-часово третиране с SDS) (26)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (27)	ET ₅₀ = 4,8 h	ET ₅₀ = 8,7 h
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (28)	ET ₅₀ = 4,0 h	ET ₅₀ = 9,0 h

Прилагане на изпитванияте и контролните химикали

22. За всеки изпитван химикал и за контролите във всяко изпитване следва да се използват най-малко три репликата. За течни, както и за твърди вещества следва да се прилага достатъчно количество от изпитвания химикал за равномерното покриване на повърхността на *епидермиса*, като същевременно се избягва прилагането на изобилна доза, т.е. следва да се използват най-малко 25 µL/cm² или 25 mg/cm². Преди прилагането на твърдите вещества повърхността на *епидермиса* следва да се овлажни с дейонизирана или дестилирана вода, за да се подобри контакта между изпитвания химикал и повърхността на *епидермиса*. Когато е възможно, твърдите вещества следва да се изпитват под формата на фин прах. В края на периода на експозиция изпитваният химикал следва внимателно да се измие от повърхността на *епидермиса* с буферен воден разтвор или 0,9 % NaCl. В зависимост от това кой от трите валидирани метода на RhE се използва, периодът на експозиция варира между 15 и 60 минути, а температурата на инкубация — между 20 и 37 °C. Тези периоди на експозиция и температури са оптимизирани за всеки метод на RhE и представляват различните присъщи свойства на методите, за подробности вж. стандартните работни процедури (СПП) за методите (26) (27) (28).
23. За да се докаже, че жизнеспособността (с ОК), бариерната функция и получената в резултат тъканна чувствителност (с ПК) на тъканите са в границите на определен от предишни изследвания интервал на приемливост, при всяко изпитване следва да се използват паралелни отрицателни (ОК) и положителни контроли (ПК). За положителна контрола е предложен 5 % воден разтвор на SDS. Като химикали за отрицателни контроли са предложени вода или буферен физиологичен разтвор с фосфат (PBS).

Измервания на клетъчната жизнеспособност

24. Най-важният елемент на процедурата за изпитване е измерванията на жизнеспособността да не се провеждат веднага след експозицията на изпитваните химикали, а в чиста среда след достатъчно дълъг инкубационен период след третирането на промитите тъкани. Този период позволява както възстановяването от леките цитотоксични ефекти, така и появата на ясно изразени цитотоксични ефекти. По време на фазата на оптимизиране на изпитването (11) (12) (13) (14) (15) беше доказано, че оптималният период на инкубация след третирането е 42 часа.
25. Изпитването с МТТ е валидиран количествен метод, който следва да се използва за измерване на клетъчната жизнеспособност съгласно настоящия МИ. Той е съвместим с използване в триизмерни тъканни модели. Кожната проба се поставя в разтвор на МТТ с подходяща концентрация (например 0,3—1 mg/mL) за 3 часа. След това утаеният син формазанов продукт се извлича от тъканта с помощта на разтворител (например изопропанол, киселинен изопропанол), а концентрацията на формазан се измерва, като се определи ОП при 570 nm, използвайки ширина на филтърната дължина на вълната най-много ± 30 nm.

▼ M3

26. Оптичните свойства на изпитвания химикал или химичното му въздействие върху МТГ могат да повлияят на изпитването, като доведат до погрешна оценка на жизнеспособността (защото изпитваният химикал може да предотврати, да предизвика или да промени оцветяването). Това може да се случи, ако определен изпитван химикал не бъде напълно отстранен от тъканта чрез промиване или когато проникне през *епидермиса*. Ако изпитваният химикал действа пряко върху МТГ (редуктор на МТГ), ако е естествено оцветен или се оцветява по време на третиране на тъканта, следва да се използват допълнителни контроли, за да се открие и коригира въздействието на изпитвания химикал върху техниката за измерване на жизнеспособността. Подробно описание на това как да се коригира пряката редукция на МТГ и въздействията на оцветителите е налично в СРП за трите валидирани метода (26) (27) (28).

Критерии за приемливост

27. За всеки модел, използващ валидни партии на модели на RhE (вж. точка 21), тъканите, третирани с отрицателната контрола, следва да показват оптична плътност, отразяваща състоянието на тъканите, които са преминали през етапите по транспортиране и приемане, както и през всички процедури по протокола. Стойностите на оптичната плътност на контролите не трябва да са по-ниски от установените граници от предишни изпитвания. По подобен начин тъканите, третирани с положителната контрола, т.е. 5 % воден разтвор на SDS, следва да отразяват способността им да реагират на дразнещ химикал при условията на МИ (26) (27) (28). Следва да се определят съответни и подходящи критерии за оценка на вариационността между тъканните репликати (например ако се използват стандартните отклонения (CO), те следва да бъдат в рамките на 1-странен интервал на толерантност от 95 %, изчислен на базата на данни от предишни изследвания; за CO на ВРМ < 18 %).

Интерпретация на резултатите и модел за прогнозиране

28. Получените стойности за оптична плътност за всеки изпитван химикал могат да се използват за изчисляването на процентната жизнеспособност, нормализирана спрямо ОК, която е определена на 100 %. Граничната стойност за процента на клетъчната жизнеспособност, която разграничава дразнещите от неклаифицираните изпитвани химикали, и статистическата(ите) процедура(и), използвана(и) за оценка на резултатите и определяне на дразнещите химикали, следва да бъдат ясно определени и документирани, както и доказано целесъобразни. Граничните стойности за прогнозиране на дразненето са дадени по-долу:

— Изпитваният химикал се счита за дразнещ кожата в съответствие с категория 2 по GHS на ООН/Регламент CLP на ЕС, ако жизнеспособността на тъканта след експозиция и инкубация след третирането е по-малка или равна (\leq) на 50 %.

— В зависимост от регулаторната рамка, в която се използват резултатите от настоящия МИ, изпитваният химикал може да се счита за недразнещ кожата в съответствие с категорията „Без категория“ по GHS на ООН/Регламент CLP на ЕС, ако жизнеспособността на тъканта след експозиция и инкубация след третирането е по-голяма ($>$) от 50 %.

ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

Данни

29. За всяко изпитване следва да се докладват в табличен вид данни от отделните тъканни репликати (например данни за стойностите на оптична плътност и изчисления процент на клетъчната жизнеспособност за всеки изпитван химикал, включително класифициране), включително данни от повторните опити, ако е целесъобразно. В допълнение следва да се докладват средните стойности \pm стандартното отклонение за всяко изпитване. Наблюдаваните взаимодействия с реагента МТГ и оцветените изпитвани химикали следва да се докладват за всеки изпитван химикал.

▼ M3*Протокол от изпитването*

30. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитвани и контролни химикали:

- химично(и) наименование(я) като CAS наименование и номер и EC наименование и номер, ако са известни;
- чистота и състав на химикала (в тегловни проценти);
- физични/химични свойства, които имат отношение към провеждането на изпитването (напр. агрегатно състояние, устойчивост, летливост, pH и разтворимост във вода, ако са известни);
- обработка на изпитваните/контролните химикали преди изпитването, ако е приложимо (напр. нагряване, стриване);
- условия за съхранение.

*Обосновка на използвания модел на RhE и протокол**Условия на изпитване:*

- използвана клетъчна система;
- пълна придружаваща информация за конкретния използван модел на RhE, включително качествените му показатели; това следва да включва, но не се ограничава до:
 - i) жизнеспособност;
 - ii) бариерна функция;
 - iii) морфология;
 - iv) възпроизводимост и предсказуемост;
 - v) контрол на качеството (КК) на модела;
- подробна информация за използваната процедура на изпитване;
- използвани дози при изпитването, продължителност на експозицията и инкубационен период след третирането;
- описание на всякакви изменения на процедурата за изпитване;
- препратка към данни за модела от предишни изпитвания; това следва да включва, но не се ограничава до:
 - i) приемливост на данните за КК по отношение на партидни данни от предишни изпитвания;
 - ii) приемливост на стойностите от положителните и отрицателните контроли по отношение на средните стойности и интервалите на положителните и отрицателните контроли;
- описание на използваните критерии за оценка, включително обосновката за избора на граничната(ите) точка(и) за модела за прогнозиране;
- препратка към контролни данни от предишни изпитвания.

▼ M3*Резултати:*

- таблично представяне на данните за отделните изпитвани химикали за всяко изпитване и всяко измерване на репликати;
- посочване на използваните контроли за преките редуктори на МТТ и/или оцветяващите изпитвани химикали;
- описание на други наблюдавани ефекти.

*Обсъждане на резултатите**Заклучение*

ЛИТЕРАТУРА

- (1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. На разположение на адрес: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]
- (2) EC-ECVAM (2009), Statement on the „Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards“, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 април 2009 г. На разположение на адрес: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (3) Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 г. относно класифицирането, етикетирането 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) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals № 404, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (5) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals № 430, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (6) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals № 431, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (7) OECD (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals № 435, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (8) EC-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? На разположение на адрес: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (9) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment № 34, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, Toxicol. in Vitro 15, 57-93.
- (11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, Toxicol. in Vitro 16, 765-770.

▼ M3

- (12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, ALTEX 21, 107–114.
- (13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test, ATLA 33, 351-367.
- (14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinstein, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329-349.
- (15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109-129.
- (16) Spielmann, H., mailto:Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559-601.
- (17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1- α . На разположение на адрес: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603-619.
- (19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tesson-neaud, E. and Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy - Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351-358.
- (20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 април 2007 г. На разположение на адрес: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. На разположение на адрес: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (22) EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 ноември 2008 г. На разположение на адрес: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (23) OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, № 137, OECD, Paris. На разположение на адрес: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]
- (24) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231-243.

▼ M3

- (25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min - 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. На разположение на адрес: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). На разположение на адрес: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42a test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. На разположение на адрес: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: *Practical Contact Dermatitis*, стр. 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
- (30) Директива 2001/59/ЕО на Комисията от 6 август 2001 г. относно двадесет и осмо 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 225, 21.8.2001 г., стр. 1.
- (31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact Dermatitis* 51, 1-4.
- (32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. and Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data, *ALTEX*, 14, 359-365.
- (33) Jirová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, *Contact Dermatitis*, 62, 109-116.

▼ M3

Допълнение 1

Определения

Точност: степента на близост на съвпадение на резултатите от метода за изпитване и приетите референтни стойности. Това е мярка за ефективността на метода за изпитване и един от аспектите на неговата приложимост. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съвпадение“, за да се обозначи делът на верните резултати на даден метод за изпитване (9).

Клетъчна жизнеспособност: параметър, измерващ общата активност на клетъчната популация, например като способност на клетъчните митохондриални дехидрогенази да намаляват постъпването на виталния оцветител МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид, тиазол синьо) в клетките, което, в зависимост от измерената крайна точка и използваната процедура на изпитване, корелира с общия брой и/или с виталността на живите клетки.

Съответствие: това е мярка за ефективността на метод за изпитване, използвана за методи за изпитване, които предоставят категоричен резултат, и е един от аспектите на приложимостта. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „точност“ и се определя като делът на всички изпитвани химикали, които са правилно класифицирани като положителни или отрицателни (9).

ET₅₀: може да се оцени чрез определяне на времето на експозиция, необходимо за намаляване на клетъчната жизнеспособност с 50 % при прилагане на химичния маркер с определена фиксирана концентрация, вж. също IC₅₀.

Регламент CLP на ЕС (Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 г. относно класифицирането, етикетирането и опаковането на вещества и смеси): въвежда в законодателството на Европейския съюз (ЕС) системата GHS на ООН за класифицирането и етикетирането на химикали (вещества и смеси) (3).

GHS (Глобална хармонизирана система за класифициране и етикетирание на химикали на Организацията на обединените нации (ООН)): система, предлагаща класифициране на химикали (вещества и смеси) според стандартизирани видове и степени на физическа, здравна и екологична опасност и разглеждаща съответни съобщителни елементи, като например пиктограми, сигнални думи, предупреждения за опасност, препоръки за безопасност и информационни листовки за безопасност, така че те да съобщават информация за тяхното неблагоприятно въздействие с оглед защита на хората (включително работодатели, работещи, служители в транспорта, потребители и аварийни служители) и на околната среда (1).

IC₅₀: може да се оцени чрез определяне на концентрацията на химичния маркер, при която жизнеспособността на тъканите се намалява с 50 % (IC₅₀) след фиксирано време на експозиция, вж. също ET₅₀.

Изобилна доза: количество от изпитвания химикал, приложено върху епидермиса, което надхвърля количеството, необходимо за пълно и равномерно покриване на повърхността на епидермиса.

Вариантен метод за изпитване (me-too test): разговорен израз за метод за изпитване, който е структурно и функционално сходен с валидиран и приет референтен метод за изпитване. Такъв метод за изпитване би могъл да подлежи на последващо валидиране. Използва се взаимозаменяемо с термина „сходен метод за изпитване“ (9).

Стандарти за ефективност (SE): стандарти въз основа на валидиран метод за изпитване, осигуряващи основата за оценка на сравнимостта на предложен метод за изпитване, който е по своя механизъм и функционално сходен с валидирания метод. Включени са: i) съществени елементи на метода за изпитване; ii) минимален списък на референтните химикали, избрани измежду химикалите, които са били използвани за доказване на приемливата ефективност на валидирания метод за изпитване; и iii) сходните нива за точност и надеждност въз основа на получените за валидирания метод за изпитване, които предложеният метод за изпитване следва да демонстрира при оценяването чрез използване на минималния списък на референтните химикали (9).

▼ M3

Референтни химикали: химикали, избрани за използване в процеса на валидиране, чиито реакции по отношение на системата за *in vitro* или *in vivo* референтни изпитвания или на представляващия интерес вид вече са известни. Тези химикали следва да бъдат представителни на класовете химикали, за които се очаква да бъде използван методът на изпитване, и следва да представляват пълния спектър от реакции, които може да се очакват от химикалите, за които може да бъде използван настоящият метод: силни, слаби и отрицателни реакции. Могат да се изискват различни набори от референтни химикали за отделните етапи на процеса на валидиране, както и за отделните методи за изпитване и отделните приложения на изпитването (9).

Приложимост: описание на взаимовръзката между изпитването и ефекта, представляващ интерес, и дали тя е значима и полезна за определена цел. Това е степента, в която изпитването правилно измерва или прогнозира биологичния ефект, представляващ интерес. Приложимостта включва разглеждането на точността (съответствието) на метода за изпитване (9).

Надеждност: мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да се извърши възпроизводимо в една и съща лаборатория и между различни лаборатории в течение на времето, когато се използва един и същи протокол. Надеждността се оценява, като се изчислява вътрешно- и между-лабораторната възпроизводимост (9).

Заместващо изпитване: изпитване, предназначено да замести изпитване, което се използва рутинно и е прието за определяне на опасността и/или оценка на риска, и за което е установено, че предоставя равностойна или по-добра защита на здравето на хората или животните или на околната среда, според приложимото, в сравнение с приетото изпитване за всички възможни изпитвани ситуации и химикали (9).

Чувствителност: делът на всички положителни/активни изпитвани химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на метода за изпитване, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на приложимостта на метода за изпитване (9).

Кожно дразнене: предизвикването на обратимо увреждане на кожата вследствие на прилагането на изпитван химикал за период от време до 4 часа. Кожното дразнене е локално възникваща, неимуногенна реакция, която се появява скоро след третирането (29). Главната му характеристика е обратимият му характер, който включва възпалителни реакции и повечето от характерните клинични признаци на дразнене (еритема, оток, сърбеж и болка), свързани с възпалителен процес.

Специфичност: делът на всички негативни/неактивни изпитвани химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на метода за изпитване, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на приложимостта на метода за изпитване (9).

Стратегия за поетапно изпитване: изпитване, при което методите за изпитване се използват поетапно; избраните методи за изпитване във всеки следващ етап се определят въз основа на резултатите от предходния етап на изпитване (9).

Изпитван химикал (също наричан изпитвано вещество): всяко вещество или смес, изпитвано(а) чрез използването на настоящия метод за изпитване.

▼ M3

Допълнение 2

Стандарти за ефективност за оценка на предложени сходни или модифицирани методи за *in vitro* изпитване за кожно дразнене върху реконструиран човешки епидермис (RhE)

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Целта на стандартите за ефективност (СЕ) е да се съобщят основанията, въз основа на които новите методи, както патентованите (т.е. защитените от авторско право, официално регистрираните с търговска марка, регистрираните), така и непатентованите, могат да бъдат определени като достатъчно точни и надеждни за целите на конкретни изпитвания. Тези СЕ, основани на валидирани и приети методи, могат да бъдат използвани за оценяване на надеждността и точността на други аналогични методи (разговорно наричани „варианти аз също“ на тестовите), които се основават на сходни научни принципи и които измерват или прогнозироват същия биологичен или токсичен ефект (9).
2. Преди приемане на модифицираните методи, т.е. предложени потенциални подобрения на одобрен метод, следва да бъде извършена оценка за определяне на ефекта на предложените изменения върху ефективността на изпитването и степента, до която тези изменения засягат наличната информация за другите елементи на процеса на валидиране. В зависимост от броя и естеството на предложените изменения, генерираните данни и придружаващата документация за тези изменения, те следва или да бъдат предмет на същия процес на валидиране, който е описан за ново изпитване, или, ако е приложимо, на ограничена оценка на надеждността и приложимостта чрез използване на приети СЕ (9).
3. Следва да бъдат оценени сходните (вариантни) методи или модификации на всеки от трите валидирани метода [EpiSkin™ (валидирания референтен метод — BPM), EpiDerm™ SIT (EPI-200) и SkinEthic™ RHE], предложени за използване съгласно настоящия метод за изпитване (МИ), за да се определят надеждността и точността им, като се използват химикали, които са представителни за пълната скала на Draize за силата на дразнене. Когато оценката се извършва с използването на 20-те препоръчителни референтни химикала на СЕ (таблица 1), предложените сходни или модифицирани методи следва да имат стойности на надеждност и точност, сравними с тези, получени при валидирания референтен метод (таблица 2) (2) (16). Стойностите на надеждност и точност, които следва да бъдат достигнати, са представени в точки 8—12 от настоящото допълнение. Включени са неклассифицирани (без категория по GHS на ООН/Регламент CLP на ЕС) и класифицирани (категория 2 по GHS на ООН/Регламент CLP на ЕС) химикали (1), представляващи различни химични класове, така че надеждността и точността (чувствителността, специфичността и цялостната точност) на предложения метод да могат да бъдат сравнени с тези на валидирания референтен метод. Надеждността на метода, както и неговата способност правилно да идентифицира дразнещи химикали от категория 2 по GHS на ООН/Регламент CLP на ЕС и в зависимост от регулаторната рамка, за която се генерират данните, също и способността му правилно да идентифицира химикали, които са без категория по GHS на ООН/Регламент CLP на ЕС, следва да бъдат определени преди използването му за изпитване на нови изпитвани химикали.
4. Тези СЕ са основани на СЕ на ЕС-ECVAM (8) и са актуализирани в съответствие със системите за класифициране и етикетирание GHS на ООН и Регламент CLP на ЕС (1) (3). Първоначалните СЕ бяха определени след завършването на изследването за валидиране (21) и бяха основани на системата за класификация на ЕС, определена в Директива 2001/59/ЕО на Комисията от 6 август 2001 г. относно двадесет и осмо адаптиране към техническия прогрес на Директива 67/548/ЕИО на Съвета за сближаването на законите, подзаконовите и административните разпоредби относно класификацията, опаковането и етиктирането на опасни вещества⁽¹⁾. СЕ бяха актуализирани поради приемането на системата за класифициране и етикетирание GHS на ООН в законодателството на ЕС (Регламент CLP на ЕС) (3), което

⁽¹⁾ ОВ L 225, 21.8.2001 г., стр. 1.

▼ M3

бе осъществено в периода между приключването на изследването за валидиране и завършването на настоящия МИ (8). Това актуализиране се отнася предимно до промени: i) в набора от референтните химикали на СЕ; и ii) определените стойности на надеждност и точност (2) (23).

СТАНДАРТИ ЗА ЕФЕКТИВНОСТ ЗА МЕТОДИ ЗА *IN VITRO* ИЗПИТВАНЕ ЗА КОЖНО ДРАЗНЕНЕ ВЪРХУ РЕКОНСТРУИРАН ЧОВЕШКИ ЕПИДЕРМИС (RHE)

5. СЕ се състоят от следните три елемента (9):

- I) Съществени елементи на метода за изпитване;
- II) Минимален списък на референтните химикали;
- III) Определени стойности на надеждност и точност.

I) Съществени елементи на метода за изпитване

6. Те се състоят от съществени структурни, функционални и процедурни елементи на валидиран метод, които следва да бъдат включени в протокола на предложен сходен по своя механизъм и функционално сходен или модифициран метод. Тези елементи включват уникални характеристики на метода, процедурни подробности от решаващо значение и мерки за контрол на качеството. Придържането към съществените елементи на метода за изпитване ще спомогне да се гарантира, че предложен сходен или модифициран метод се основава на същите концепции като съответния валидиран референтен метод — ВРМ (9). Съществените елементи на метода за изпитване са подробно описани в точки 16—21 на МИ и изпитването следва да бъде проведено съгласно следните условия:

- общите условия (точка 16);
- функционалните условия, които включват:
 - жизнеспособност (точка 17);
 - бариерна функция (точка 18);
 - морфология (точка 19);
 - възпроизводимост (точка 20); както и
 - контрол на качеството (точка 21).

II) Минимален списък на референтните химикали

7. Референтните химикали се използват, за да се определи дали надеждността и точността на предложен сходен или модифициран метод, за който е доказано, че е достатъчно структурно и функционално сходен с валидиращия референтен метод (ВРМ), или който представлява незначително изменение на някой от трите валидирани метода, са сравними със или по-добри от тези на ВРМ (2) (8) (16) (23). 20-те препоръчителни референтни химикала, посочени в таблица 1, включват химикали, представляващи различни химични класове (т.е. химични категории, основани на функционалните групи), и са представителни за пълната скала на Draize за силата на дразнене (от недразнител до силен дразнител). Включените в този списък химикали включват 10 химикала от категория 2 по GHS на ООН/Регламент CLP на ЕС и 10 некатегоризирани химикала, от които 3 химикала са от незадължителната категория 3 по GHS на ООН. Съгласно разглеждания тук метод за изпитване класифицирането в незадължителната категория 3 се счита за класифициране без категория. Химикалите, посочени в таблица 1, са избрани измежду химикалите, използвани във фазата на оптимизиране, следваща фазата преди валидирането, и в изследването за валидиране на ВРМ, по отношение на химичната функционалност и агрегатното състояние (14) (18). Тези референтни химикали представляват минималния брой химикали, които следва да бъдат използвани за оценка на точността и надеждността на предложен сходен или модифициран метод, но не са предназначени да бъдат използвани при разработването на нови методи. Когато даден химикал от списъка не е на разположение, биха могли да се

▼ M3

използват други химикали, за които са налице подходящи *in vivo* референтни данни, предимно химикали измежду тези, използвани във фазата на оптимизиране, следваща фазата преди валидирането, и в изследването за валидиране на ВРМ. При желание към минималния списък на референтните химикали могат да бъдат прибавени допълнителни химикали, които представляват други химични класове и за които са налице подходящи *in vivo* референтни данни, с цел допълнителна оценка на точността на предложения метод.

Таблица 1

Минимален списък на референтните химикали за определяне на стойностите на точност и надеждност за сходни или модифицирани методи на RhE за кожно дразнене ⁽¹⁾

Химикал	CAS номер	Агрегатно състояние	Балова оценка <i>in vivo</i>	ВРМ <i>in vitro</i> категория	<i>In vivo</i> категория по GHS на ООХ/ Регламент CLP на ЕС
1-бromo-4-хлорбутан	6940-78-9	Течно	0	Категория 2	Без категория
Диетил фталат	84-66-2	Течно	0	Без категория	Без категория
Нафтилоцетна киселина	86-87-3	Твърдо	0	Без категория	Без категория
Алил феноксиацетат	7493-74-5	Течно	0,3	Без категория	Без категория
Изопропанол	67-63-0	Течно	0,3	Без категория	Без категория
4-метил-тио-бензалдехид	3446-89-7	Течно	1	Категория 2	Без категория
Метилов стеарат	112-61-8	Твърдо	1	Без категория	Без категория
Хептил бутират	5870-93-9	Течно	1,7	Без категория	Без категория
Хексил салицилат	6259-76-3	Течно	2	Без категория	Без категория
Канелен алдехид	104-55-2	Течно	2	Категория 2	Без категория (Незадължителна категория 3) ⁽³⁾
1-деканол ⁽²⁾	112-30-1	Течно	2,3	Категория 2	Категория 2
Цикламен алдехид	103-95-7	Течно	2,3	Категория 2	Категория 2
1-бромхексан	111-25-1	Течно	2,7	Категория 2	Категория 2
2-хлорометил-3,5-диметил-4-метокси-пиридин хидрохлорид	86604-75-3	Твърдо	2,7	Категория 2	Категория 2
Ди-н-пропил дисулфид ⁽²⁾	629-19-6	Течно	3	Без категория	Категория 2
Калиев хидроксид (5 % воден разтвор)	1310-58-3	Течно	3	Категория 2	Категория 2
Бензениол, 5-(1,1-диметилетил)-2-метил	7340-90-1	Течно	3,3	Категория 2	Категория 2
1-метил-3-фенил-1-пиперазин	5271-27-2	Твърдо	3,3	Категория 2	Категория 2

▼ M3

Химикал	CAS номер	Агрегатно състояние	Балова оценка <i>in vivo</i>	BPM <i>in vitro</i> категория	<i>In vivo</i> категория по GHS на ООН/ Регламент CLP на ЕС
Хептанал	111-71-7	Течно	3,4	Категория 2	Категория 2
Тетрахлоретилен	127-18-4	Течно	4	Категория 2	Категория 2

(¹) Изборът на химикалите се основава на следните критерии: i) химикалите се предлагат на пазара; ii) представителни са за пълната скала на Draize за силата на дразнене (от недразнител до силен дразнител); iii) имат ясно определена химична структура; iv) представителни са за химичната функционалност, използвана в процеса на валидиране; и v) нямат прекомерно токсичен профил (например канцерогенен или токсичен по отношение на репродуктивната система) и разходите за обезвреждането им не са прекалено високи.

(²) Химикали, които са дразнителни при зайците, но за които има надеждни доказателства, че не предизвикват дразнене при хората (31) (32) (33).

(³) По GHS на ООН, не присъства в Регламент CLP на ЕС.

III) Определени стойности на надеждност и точност

8. За целите на определяне на надеждността и приложимостта на предложените сходни или модифицирани методи, които подлежат на трансферирание между лабораториите, съответни тестове с използването на всичките 20 референтни химикала, посочени в таблица 1, следва да бъдат проведени в поне три лаборатории. При все това, ако предложеният метод ще бъде използван само в една лаборатория, за целите на валидирането няма да бъде изисквано изпитване в много лаборатории. От съществено значение е обаче тези изследвания за валидиране да бъдат независимо оценявани от международно признати валидационни органи съгласно международните указания (9). Всички 20 референтни химикала следва да бъдат изпитвани в рамките на три независими изпитвания във всяка лаборатория, извършвани с различни партии на тъкани и на достатъчни големи интервали от време. Всяко изпитване следва да се състои от минимум три едновременно изпитвани тъканни репликата за всеки включен изпитван химикал, отрицателни контроли (ОК) и положителни контроли (ПК).

9. Изчисляването на стойностите на надеждността и точността на предложения метод следва да се извърши при едновременно отчитане на всички четири критерия, посочени по-долу, като се гарантира, че стойностите за надеждност и приложимост са изчислени по предварително определен и последователен начин.

1. Само данните от провеждането на пълни цикли на изпитвания отговарят на критериите за изчисляване на вътрешно- и междулабораторната вариационност и прогнозния капацитет (точността) на метода.
2. Окончателната класификация на всеки референтен химикал във всяка участваща лаборатория следва да бъде получена, като се използва средната стойност на жизнеспособността по време на отделно проведените изпитвания от един пълен цикъл от изпитвания.
3. Само данните, получени за химикали, с които са проведени пълни цикли от изпитвания във всички участващи лаборатории, отговарят на критериите за изчисляване на междулабораторната вариационност на метода.
4. Изчисляването на стойностите на точност следва да бъде извършено въз основа на прогнозите на отделни лаборатории, получени за 20-те референтни химикала от различните участващи лаборатории.

В този контекст един **цикъл от изпитвания** се състои от три независими изпитвания, извършени от една лаборатория за един изпитван химикал. **Пълен цикъл от изпитвания** представлява цикъл от изпитвания, извършвани от една лаборатория за един изпитван химикал, когато всички три изпитвания са валидни. Това означава, че всяко отделно невалидно изпитване прави невалиден целия цикъл от изпитвания, състоящ се от три изпитвания.

Вътрешнолабораторна възпроизводимост

10. Оценката на вътрешнолабораторната възпроизводимост следва да показва съответствие на класификациите (категория 2 и без категория по GHS на ООН/Регламент CLP на ЕС), получени при различни, независимо проведени изпитвания на 20-те референтни химикала в рамките на една лаборатория, равно на или по-голямо (\geq) от 90 %.

▼ M3

Междулабораторна възпроизводимост

11. Оценката на междулабораторната възпроизводимост не е от съществено значение, ако предложеният метод за изпитване се използва единствено в една лаборатория. За методи, които подлежат на трансферирание между лаборатории, съответствието на класификациите (категория 2 и без категория по GHS на ООН/Регламент CLP на ЕС), получени при различни, независимо проведени изпитвания на 20-те референтни химикала препоръчително между най-малко три лаборатории, следва да бъде равно на или по-голямо (\geq) от 80 %.

Прогнозен капацитет (точност)

12. Точността (чувствителността, специфичността и цялостната точност) на предложени сходен или модифициран метод следва да бъде сравнима с или по-добра от тази на ВРМ, като се взема предвид допълнителната информация, свързана с приложимостта при видовете, представляващи интерес (таблица 2). Чувствителността следва да бъде равна на или по-голяма (\geq) от 80 % (2) (8) (23). При все това по отношение на чувствителността на предложени метод *in vitro* е валидно допълнително ограничение на специфичността, съгласно което само два химикала от категория 2 по класификация *in vivo*, *1-деканол* и *ди-н-пропил дисулфид*, могат да бъдат класифицирани неправилно като химикали без категория от повече от една участваща лаборатория. Специфичността следва да бъде равна на или по-голяма (\geq) от 70 % (2) (8) (23). Не е налице последващо ограничение по отношение на специфичността на предложени метод *in vitro*, т.е. всяка една участваща лаборатория може да класифицира неправилно който и да било химикал без категория по класификация *in vivo*, при условие че окончателната специфичност на метода за изпитване попада в рамките на приемливия интервал. Цялостната точност следва да бъде равна на или по-голяма (\geq) от 75 % (2) (8) (23). Въпреки че чувствителността на ВРМ, изчислена за 20-те референтни химикала, посочени в таблица 1, е равна на 90 %, определената минимална стойност на чувствителността, изисквана за всеки сходен или модифициран метод, за да бъде счетен за валиден, е определена на 80 %, тъй като както *1-деканол* (химикал с гранични резултати), така и *ди-н-пропил дисулфид* (химикал с погрешно отрицателни резултати при ВРМ) са известни като непредизвикващи дразнене при хората (31) (32) (33), въпреки че се идентифицират като дразнителни при изпитването върху зайци. Тъй като моделите на RhE се основават на клетки от човешки произход, те могат да предвидят, че тези химикали не предизвикат дразнене (без категория по GHS на ООН/Регламент CLP на ЕС).

Таблица 2

Изисквани прогнозни стойности за чувствителност, специфичност и цялостна точност за всеки сходен или модифициран метод, за да бъде счетен за валиден

Чувствителност	Специфичност	Цялостна точност
$\geq 80 \%$	$\geq 70 \%$	$\geq 75 \%$

Критерии за приемане на изпитването

13. Възможно е едно или няколко изпитвания, свързани с един или повече изпитвани химикала, да не отговаря(т) на критериите за приемане на изпитването за изпитваните и контролните химикали или да не е/са приемливо(и) по други причини. За допълване на липсващите данни е допустимо извършването на максимум две допълнителни изпитвания за всеки изпитван химикал („повторно изпитване“). По-точно, тъй като в случая на повторно изпитване трябва да бъдат едновременно изпитвани и ПК, и ОК, за всеки изпитван химикал могат да бъдат извършени максимум две допълнителни изпитвания.
14. Възможно е дори след повторно изпитване минималният брой от три валидни изпитвания, изискван за всеки изпитван химикал, да не бъде получен за всеки референтен химикал във всяка участваща лаборатория, което води до матрица с непълни данни. В такива случаи следва да бъдат изпълнени едновременно следните три критерия, за да бъдат счетени наборите от данни за приемливи:
1. Всички 20 референтни химикала следва да преминат през поне един пълен цикъл от изпитвания.

▼ M3

2. Във всяка от поне три участващи лаборатории е необходимо минимум 85 % от циклите от изпитвания да бъдат пълни (за 20 химикала; т.е. позволени са 3 невалидни цикъла от изпитвания в една лаборатория).
3. Минимум 90 % от всички възможни цикли от изпитвания от поне три лаборатории е необходимо да бъдат пълни (за 20 химикала, изпитвани в три лаборатории; т.е. позволени са общо 6 невалидни цикъла от изпитвания).

▼ M7

Б.47. МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ НА НЕПРОЗРАЧНОСТ И ПРОПУСКЛИВОСТ НА ГОВЕЖДАТА РОГОВИЦА ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА I) ХИМИКАЛИ, ПРЕДИЗВИКВАЩИ СЕРИОЗНО УВРЕЖДАНЕ НА ОЧИТЕ, И II) ХИМИКАЛИ, КОИТО НЕ ИЗИСКВАТ КЛАСИФИЦИРАНЕ ЗА ДРАЗНЕНЕ НА ОЧИТЕ ИЛИ СЕРИОЗНО УВРЕЖДАНЕ НА ОЧИТЕ

ВЪВЕДЕНИЕ

Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (ТГ) 437 (2013). Методът за изпитване на непрозрачност и пропускливост на говеждата роговица (НПГР) е оценен през 2006 и 2010 г. от Междуведомствения координационен комитет за валидиране на алтернативни методи (ICCVAM), съвместно с Европейския център за валидиране на алтернативни методи (ECVAM) и Японския център за валидиране на алтернативни методи (JaCVAM) (1)(2). В първата оценка методът за изпитване НПГР е оценен по отношение на полезността му за идентифициране на химикали (вещества и смеси), предизвикващи сериозно увреждане на очите (1). Във втората оценка методът за изпитване НПГР е оценен по отношение на полезността му за идентифициране на химикали (вещества и смеси), които не са класифицирани за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите (2). Базата данни за валидиране на метода за изпитване НПГР съдържа общо 113 вещества и 100 смеси (2) (3). От тези оценки и тяхната партньорска оценка се стигна до заключението, че чрез метода за изпитване могат да правилно се идентифицират химикали (както вещества, така и смеси), предизвикващи сериозно увреждане на очите (категория 1), както и такива, които не изискват класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите, както са определени в Глобалната хармонизирана система на Организацията на обединените нации (ООН) за класифициране и етикетиране на химикали (GHS) (4) и в Регламент (ЕО) № 1272/2008 относно класифицирането, етикетирането и опаковането на вещества и смеси (CLP) (1) и поради това той беше одобрен като научно валиден и за двете цели. Сериозно увреждане на очите означава тъканно увреждане в очите или сериозно физическо увреждане на зрението в резултат на прилагането на изпитван химикал върху предната повърхност на очите, което не е напълно обратимо в рамките на 21 дни след прилагането му. Изпитваните химикали, предизвикващи сериозно увреждане на очите, се класифицират в категория 1 на GHS на ООН. Химикалите, които не са класифицирани за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите, са определени като такива, които не отговарят на изискванията за класифициране като категория 1 или 2 (2А или 2В) по GHS на ООН, т.е. те се наричат „без категория“ по GHS на ООН. Настоящият метод за изпитване обхваща препоръчителното използване и ограниченията на метода за изпитване НПГР въз основа на оценките на този метод. Основните разлики между първоначалния вариант за 2009 г. и актуализираната версия от 2013 г. на насоките за изпитване на ОИСП се отнасят, но не се ограничават до: използването на метода за изпитване НПГР за идентифициране на химикали, за които не се изисква класифициране съгласно GHS на ООН (точки 2 и 7); разяснения относно приложимостта на метода за изпитване НПГР за изпитването на алкохоли, кетони и твърди вещества (точки 6 и 7) и на вещества и смеси (точка 8); разяснения относно начина, по който следва да бъдат изпитвани повърхностноактивните вещества и смесите, съдържащи повърхностноактивни вещества (точка 28); актуализации и разяснения по отношение на положителни контроли (точки 39 и 40); актуализация на критериите за вземане на решение на метода за изпитване НПГР (точка 47); актуализация на критериите за приемане на изследването (точка 48); актуализация на елементите на протокола от изпитването (точка 49); актуализация на допълнение 1 по отношение на определения; добавянето на допълнение 2 за капацитета за прогнозиране на метода за изпитване НПГР при различните системи за класифициране; актуализиране на допълнение 3 относно списъка на химикали за изпитването за пригодност; и актуализация на допълнение 4 по отношение на държателя за роговица за НПГР (точка 1) и измервателното устройство за непрозрачност (точки 2 и 3).

(1) Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 г. относно класифицирането, етикетирането 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).

▼ M7

Понастоящем е общоприето, че в обозримо бъдеще, нито едно изпитване *in vitro* за дразнене на очите няма да е в състояние да замести изпитването *in vivo* на Draize за действие върху очите при прогнозирането в целия спектър на дразнене, за различните класове химикали. При все това стратегическите комбинации от няколко алтернативни методи на изпитване в рамките на стратегия за поетапно изпитване може да са в състояние да заместят изпитването на Draize за действие върху очите (5). Подходът „отгоре надолу“ (5) е създаден да се използва, когато въз основа на съществуваща информация за даден химикал се очаква висок потенциал за дразнещо действие, а подходът „отдолу-нагоре“ (5) е създаден да се използва, когато въз основа на съществуващата информация за даден химикал се очаква, че няма да причини дразнене на очите, което да е достатъчно за да се изисква класифициране. Методът за изпитване НПГР е метод за изпитване *in vitro*, който може да се използва при определени обстоятелства и, със специфични ограничения, за класифициране и етикетирание на химикали за опасност за очите. Въпреки че не се смята за валиден като самостоятелен заместител на изпитването *in vivo* върху очи на зайци, методът за изпитване НПГР се препоръчва като първоначална стъпка в рамките на стратегия за изпитване, като например подхода „отгоре надолу“, предложен от Scott et al. (5) за идентифициране на химикали, предизвикващи сериозно увреждане на очите, т.е. химикали, които следва да бъдат класифицирани като категория 1 по GHS на ООН без по-нататъшно изпитване (4). Методът за изпитване НПГР се препоръчва и за идентифициране на химикали, които не изискват класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите, както е определено от GHS на ООН („без категория“ по GHS на ООН) (4) в рамките на стратегия за изпитване, като например подходът „отдолу нагоре“ (5). Независимо това, даден химикал, за който не се прогнозира, че причинява сериозно увреждане на очите или не е класифициран за дразнене на очите/сериозно увреждане на очите с метода за изпитване НПГР, изисква допълнително изпитване (*in vitro* и/или *in vivo*) за определяне на окончателно класифициране.

Целта на настоящия метод за изпитване е да се опишат процедурите, използвани за оценка на потенциалната опасност за очите на изпитвания химикал, измерена чрез способността му да предизвиква непрозрачност и повишена пропускливост върху изолирана говежда роговица. Токсичният ефект върху роговицата се измерва чрез: i) намалено преминаване на светлина (непрозрачност), и ii) повишено пропускане на оцветител натриев флуоресцеин (пропускливост). Оценките за непрозрачността и пропускливостта на роговицата след експозиция на изпитвания химикал се комбинират, за да се получи *in vitro* балова оценка за дразнещото действие (ИВБОДД), която се използва за класифициране на степента на дразнещо действие на изпитвания химикал.

Определенията са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Този метод за изпитване се базира на протокола за метода за изпитване НПГР на ICCVAM (6) (7), който първоначално е разработен от информация, получена от протокола на Института за *in vitro* науки (IIVS) и от протокол 124 на INVITTOX (8). Последният протокол представлява протоколът, използван за предхождащо валидирането изследване, финансирано от Европейската общност и проведено през периода 1997-1998 г. Тези два протокола се базират на метода за изпитване НПГР, за първи път протоколиран от Gautheron et al. (9).

Методът за изпитване НПГР може да се използва за определяне на химикали, предизвикващи сериозно увреждане на очите, както е определено в GHS на ООН, т.е. химикали, които следва да бъдат класифицирани като категория 1 по GHS на ООН (4). Когато методът за изпитване НПГР се използва за тази цел, той е с обща точност от 79 % (150/191), процент неверни положителни резултати 25 % (32/126), и процент неверни отрицателни резултати 14 % (9/65), в сравнение с данните от метода за изпитване *in vivo* върху очи на зайци, класифицирани според системата за класифициране GHS на ООН (3) (вж. допълнение 2, таблица 1). Когато изпитвани химикали от определени химични (напр. алкохоли, кетони) или физични (напр. твърди вещества) класове бъдат изключени от базата данни, методът за изпитване НПГР е с обща точност от 85 % (111/131), процент неверни положителни резултати 20 % (16/81) и процент неверни отрицателни резултати 8 % (4/50) за системата за класифициране GHS на ООН (3). Потенциалните недостатъци на метода за изпитване НПГР, когато се използва за определяне на химикали, предизвикващи сериозно увреждане на

▼ M7

очите (категория 1 по GHS на ООН), се основават на високите проценти неверни положителни резултати за алкохоли и кетони и високия процент неверни отрицателни резултати за твърди вещества, отчетени в базата данни за валидиране (1) (2) (3). Независимо от това това, тъй като не всички прогнозни стойности за алкохоли и кетони са надценени от метода за изпитване НППР и някои са правилно прогнозирани като категория 1 по GHS на ООН, за тези две органични функционални групи не се счита, че са извън областта на приложимост на метода за изпитване. От използващия настоящия метод за изпитване зависи решението дали евентуална надценена прогнозна стойност за алкохол или кетон може да бъде приета или следва да бъде извършено допълнително изпитване с подход, основан на тежестта на доказателствата. По отношение на процентите на неверните отрицателни резултати за твърди вещества следва да се отбележи, че твърдите вещества могат да доведат до променливи и екстремни условия на експозиция в *in vivo* изпитването на Draize за дразнещо действие върху очите, което може да доведе до неотнормирани прогнози на техния действителен дразнещ потенциал (10). Следва също така да се отбележи, че нито един от неверните отрицателни резултати, определени в базата данни за валидирането на ICCVAM (2) (3) в контекста на идентифицирането на химикали, предизвикващи сериозно увреждане на очите (категория 1 по GHS на ООН), не е довел до ИВБОДД ≤ 3 , какъвто е критерият, използван за идентифициране на даден изпитван химикал като „без категория“ по GHS на ООН. Освен това в този контекст неверните отрицателни резултати по НППР не са от критично значение, тъй като всички изпитвани химикали, които са с $3 < \text{ИВБОДД} \leq 55$, след това ще бъдат изпитвани с други достатъчно валидирани *in vitro* изпитвания или, като последна възможност, върху зайци, в зависимост от регулаторните изисквания, като се прилага стратегия за последователно изпитване с подход, основан на тежестта на доказателствата. Като се има предвид факта, че стойностите за някои твърди химикали са прогнозирани коректно по метода за изпитване НППР като категория 1 по GHS на ООН, за това агрегатно състояние също не се смята, че е извън областта на приложимост на метода за изпитване. Изследователите биха могли да разгледат възможността за използване на този метод за изпитване за всякакви типове химикали, при които ИВБОДД > 55 следва да се приеме за показател за отклик с предизвикване на сериозно увреждане на очите, който следва да се класифицира като категория 1 по GHS на ООН без по-нататъшно изпитване. Независимо от това, както вече беше упоменато, положителните резултати, получени от алкохоли или кетони, следва да се тълкуват предпазливо, поради евентуално надценяване на прогнозните стойности.

Методът за изпитване НППР може също така да се използва за определяне на химикали, които не изискват класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите по системата за класифициране GHS на ООН (4). Когато методът за изпитване НППР се използва за тази цел, той е с обща точност от 69 % (135/196), процент неверни положителни резултати 69 % (61/89), и процент неверни отрицателни резултати 0 % (0/107), в сравнение с данните от *in vivo* метода за изпитване върху очи на зайци, класифицирани според системата за класифициране GHS на ООН (3) (вж. допълнение 2, таблица 2). Полученият процент неверни положителни резултати (химикали „без категория“ по GHS на ООН, предизвикващи *in vivo* ИВБОДД > 3 , вж. точка 47) е значително по-висок, но не е от критично значение в този контекст, тъй като всички изпитвани химикали, които са с $3 < \text{ИВБОДД} \leq 55$, след това ще бъдат изпитвани с други достатъчно валидирани *in vitro* изпитвания или, като последна възможност, върху зайци, в зависимост от регулаторните изисквания, като се прилага стратегия за последователно изпитване с подход, основан на тежестта на доказателствата. Методът за изпитване НППР не проявява специфични недостатъци при изпитването на алкохоли, кетони и твърди вещества, когато целта е идентифициране на химикали, които не изискват класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите („без категория“ по GHS на ООН) (3). Изследователите биха могли да разгледат възможността за използване на този метод за всякакви типове химикали, при които отрицателният резултат (ИВБОДД ≤ 3) следва да се приеме като показващ, че не се изисква класифициране („без категория“ по GHS на ООН). Тъй като методът за изпитване НППР може да идентифицира правилно само 31 % от химикалите, за които не се изискват класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите, настоящият метод за изпитване не следва да бъде първият избор за започване на подход „отдолу нагоре“ (5), ако са на разположение други валидирани и приети *in vitro* методи с подобна висока чувствителност, но с по-висока специфичност.

▼ M7

Базата данни за валидиране на метода за изпитване НППР съдържа общо 113 вещества и 100 смеси (2) (3). Поради това методът за изпитване НППР се смята за приложим за изпитването както на вещества, така и на смеси.

Методът за изпитване НППР не се препоръчва за идентифицирането на изпитваните химикали, които следва да бъдат класифицирани като дразнещи за очите (категория 2 или категория 2A по GHS на ООН) или на изпитваните химикали, които следва да бъдат класифицирани като леко дразнещи за очите (категория 2B по GHS на ООН) поради значителния брой химикали от категория 1 по GHS на ООН, класифицирани на пониско ниво като химикали от категория 2, 2A или 2B по GHS на ООН, или химикали „без категория“ по GHS на ООН, класифицирани на високо ниво като химикали от категория 2, 2A или 2B по GHS на ООН (2) (3). За тази цел може да се изисква допълнително изпитване с друг подходящ метод.

Всички процедури с говежди очи и говежда роговица следва да съответстват на приложимите за изпитващата лаборатория разпоредби и процедури за работа с материали с животински произход, които включват тъкани и тъкани течности, но не се ограничават само до тях. Препоръчва се спазването на универсалните лабораторни предпазни мерки (11).

Въпреки че методът за изпитване НППР не разглежда уврежданията на конюнктивата и ириса, той се отнася до действията върху роговицата, които са основната движеща сила за класифициране *in vivo* при разглеждането на Глобалната хармонизирана система на ООН за класифициране. Обратимостта на уврежданията на роговицата не може да се оцени сама по себе си чрез метода за изпитване НППР. Въз основа на изследванията върху заешки очи бе предложено оценката за първоначалната дълбочина на увреждането на роговицата да се използва за определяне на някои типове необратими ефекти (12). Необходими са обаче нови научни познания, за да се разбере как настъпват необратимите ефекти, които не са свързани с първоначално високо равнище на увреждане. В заключение, методът за изпитване НППР не позволява да се направи оценка на потенциала за обща токсичност, свързан с експозицията на очите.

Настоящият метод за изпитване ще бъде актуализиран периодично при вземане под внимание на нова информация и данни. Например, хистопатологията може потенциално да е от полза при необходимост от по-пълна характеристика на увреждането на роговицата. Както е очертано в Ръководство на ОИСР № 160 (13), потребителите се насърчават да съхранят роговицата и да приготвят хистопатологични образци, които могат да се използват за разработването на база данни и критерии за вземане на решение, които могат допълнително да подобрят точността на настоящия метод за изпитване.

Всяка лаборатория, която за първи път започва да прилага настоящия метод за изпитване, следва да използва химикалите за изпитване за пригодност, посочени в Допълнение 3. Лабораториите могат да използват тези химикали за доказване на своята техническа компетентност за прилагане на метода за изпитване НППР преди предаване на данните от метода за изпитване НППР за целите на регулаторното класифициране според степента на опасност.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

Методът за изпитване НППР е органотипен модел, който осигурява краткотрайно поддържане на нормалната физиологична и биохимична функция на говеждата роговица *in vitro*. При този метод за изпитване увреждането, причинено от изпитвания химикал, се оценява посредством количествени измервания на измененията в непрозрачността и пропускливостта на роговицата, извършвани съответно с измервателно устройство за непрозрачност и спектрофотометър във видимата област. Двете измервания се използват за изчисляване на *in vitro* балова оценка за дразнещото действие (ИВБДД), която се използва за *in vitro* категоризиране според класификацията по степен на опасност от дразнещо действие за прогнозиране на потенциала *in vivo* за дразнещо действие върху очите на изпитвания химикал (вж. критериите за решение в точка 48).

За метода за изпитване НППР се използва изолирана роговица от очите на прясно заклан едър рогат добитък. Непрозрачността на роговицата се измерва количествено чрез количеството светлина, преминало през роговицата. Пропускливостта се измерва количествено като количеството оцветител натриев флуоресцеин, което преминава през цялата дебелина на

▼ **M7**

роговицата, отчетено в средата в задното отделение. Изпитваните химикали се прилагат върху епителната повърхност на роговицата чрез добавяне в предното отделение на държателя за роговицата. В Допълнение 4 са дадени описание и схема на държател за роговицата, използван за метода за изпитване НППР. Държатели за роговица могат да се набавят от различни източници на пазара или да се изработят.

Източник и възраст на говеждите очи и избор на животински вид

Едрият рогат добитък, който се изпраща за клане, обикновено се използва за консумация от човека или за други търговски цели. Като източник на роговица за целите на метода за изпитване НППР се използват само здрави животни, смятани за подходящи за включване в хранителната верига на човека. Тъй като едрият рогат добитък може да бъде с различно тегло според породата, възрастта и пола, няма изискване за препоръчително тегло на животните при клане.

Когато се използват очи от различни по възраст животни, могат да се получат разлики в размерите на роговицата. Роговицата на едър рогат добитък на възраст над осем години обикновено е с хоризонтален диаметър $> 30,5$ mm и дебелина в средата на роговицата (CCT) ≥ 1 100 μ m, докато роговица с хоризонтален диаметър $< 28,5$ mm и CCT < 900 μ m обикновено се получава от едър рогат добитък на възраст под пет години (14). Поради това обикновено не се използват очи от едър рогат добитък на възраст над 60 месеца. Обичайно е да не се използват очи от едър рогат добитък на възраст под 12 месеца, тъй като тогава те все още са в развитие и дебелината и диаметърът на роговицата са значително по-малки от протоколираните за очи от възрастен добитък. Все пак се допуска да се използва роговица от млади животни (т.е. на възраст от 6 до 12 месеца), тъй като това дава някои предимства, като по-лесно набавяне, по-малък възрастов диапазон и намалена опасност, свързана с потенциална експозиция на работещите на спонгиозна енцефалопатия по говедата (15). Тъй като ще бъде от полза оценката на ефекта от размерите или дебелината на роговицата върху реагирането спрямо химикали с корозивно и дразнещо действие да продължи, потребителите се насърчават да протоколират предполагаемата възраст и/или тегло на животните, от които се доставя използваната в изследването роговица.

Събиране и транспортиране на очите до лабораторията

Очите се събират от работещите в клиниката. За минимизиране на механичните и други типове увреждания на очите, очите следва да бъдат извадени възможно най-бързо след умъртвяването и охладени незабавно след изваждането и по време на транспортирането. За да се избегне излагането на очите на въздействието на химикали с потенциално дразнещо действие, работещите в клиниката не трябва да използват детергенти при миенето на главите на животните.

Очите следва да бъдат изцяло потопени в охладен балансиран солен разтвор на Ханкс (HBSS) в съд с подходящи размери и транспортирани до лабораторията по начин, по който се свежда до минимум развалянето и/или бактериалното замърсяване. Тъй като очите се вземат по време на кланичния процес, те може да са експонирани на кръв и други биологични материали, включително бактерии и други микроорганизми. Поради това е важно да се осигури свеждане до минимум на риска от замърсяване [напр. като съдът с очите се държи върху мокър лед по време на пробовземането и транспортирането, и чрез добавяне на антибиотици към HBSS, в който се съхраняват очите при транспортирането (напр. 100 IU/ml пеницилин и 100 mg/ml стрептомицин)].

Интервалът от време между пробовземането на очите и използването на роговицата за метода за изпитване НППР следва да бъде сведен до минимум (обикновено пробовземането и използването става в рамките на един и същ ден) и следва да се докаже, че не компрометира резултатите от изследването. Тези резултати се базират на критериите за подбор за очите, както и на отклика на положителната и отрицателната контрола. Всички очи, използвани в изследването, следва да бъдат от една и съща група очи, пробовзета през даден ден.

Критерии за подбор за очи, използвани в метода за изпитване НППР

След пристигане в лабораторията очите се оглеждат внимателно за дефекти, включително за увеличена непрозрачност, драскотини и неоваскуларизация. Използват се само роговици от очи без такива дефекти.

▼ **M7**

Качеството на всяка роговица се оценява също и на по-късните етапи в изследването. Роговици, чиято непрозрачност надвишава седем единици за непрозрачност или стойност, еквивалентна за използваните измервателно устройство за непрозрачност и държатели за роговица, след първоначален период от един час за достигане на равновесие, следва да бъдат изхвърлени (БЕЛЕЖКА: измервателното устройство за непрозрачност следва да бъде калибрирано с еталони за непрозрачност, използвани за установяването на единиците за непрозрачност, вж. допълнение 4).

Всяка третирана група (изпитван химикал, паралелни отрицателна и положителна контроли) се състои от минимум три очи. За отрицателната контрола в метода за изпитване НППР следва да се използват три роговици. Тъй като всички роговици са изрязани от цялата очна ябълка и поставени в отделенията за роговица, съществува вероятност стойностите за непрозрачност и пропускливост за отделните роговици (включително отрицателната контрола) да бъдат повлияни в резултат на човешката намеса при манипулациите. Освен това стойностите за непрозрачност и пропускливост от роговиците от отрицателната контрола се използват за коригиране на стойностите за непрозрачност и пропускливост на роговицата от третираната с химикала проба и от положителната контрола при изчисляването на ИВБОДД.

ПРОЦЕДУРА**Приготвяне на очите**

Върху свободна от дефекти роговица се прави разрез, така че от склерата да остане пръстен от 2 до 3 мм за улесняване на последващите манипулации, като се внимава да се избягва увреждане на епитела и ендотела на роговицата. Изолираните роговици се поставят в специално изработени държатели за роговица, които се състоят от предно и задно отделение, които са съответно откъм епителната и ендотелната страна на роговицата. Двете отделения са пълни до преливане с предварително затоплена среда ЕМЕМ (Eagle's Minimum Essential Medium) без фенолово червено (първо задното отделение), като се внимава да няма мехури. След това устройството се уравнива при 32 ± 1 °C в продължение на най-малко един час, за да може роговицата да достигне равновесие със средата и да се достигне до нормална метаболитна активност в степента, в която това е възможно (приблизителната температура на повърхността на роговицата *in vivo* е 32 °C).

След периода на достигане на равновесие, в двете отделения се добавя прясна предварително затоплена среда ЕМЕМ без фенолово червено и се отчитат базовите стойности за непрозрачността за всяка роговица. Роговиците с макроскопични тъканни увреждания (напр. дракотини, пигментация, неоваскуларизация) или непрозрачност > седем единици или стойност, еквивалентна за използваните измервателно устройство за непрозрачност и държатели за роговица, се изхвърлят. Най-малко три роговици се избират за отрицателна контрола (или контрола на разтворител). Останалите роговици се разпределят на групи за третиране и положителни контролни групи.

Тъй като топлинният капацитет на водата е по-висок от този на въздуха, водата осигурява по-стабилни температурни условия за инкубация. Поради това се препоръчва да се използва водна баня за поддържане на температура от 32 ± 1 °C на държателя и неговото съдържание. От друга страна, могат да се използват и въздушни инкубатори, като се вземат необходимите мерки температурата да се поддържа стабилна (напр. като се затоплят предварително държателят и средата).

Прилагане на изпитвания химикал

Използват се два различни протокола за третиране — един за течности и повърхностноактивни вещества (твърди или течни) и един за твърди вещества, различни от повърхностноактивни.

Течностите се изпитват неразредени. Полутвърди вещества, кремообразни вещества и парафини обикновено се изпитват във вид на течности. Повърхностноактивните вещества в чист вид се изпитват при концентрации от 10 % w/v в 0,9 % разтвор на натриев хлорид, дестилирана вода или друг разтворител, за който е доказано, че не влияе неблагоприятно върху системата за изпитване. За използване на други концентрации на

▼ M7

разреждане следва да се предостави подходяща обосновка. Смеси, съдържащи повърхностноактивни вещества, могат да се изпитват неразредени или разредени до подходяща концентрация в зависимост от относимия сценарий на експозиция *in vivo*. За изпитваната концентрация следва да се предостави подходяща обосновка. Роговицата се експонира на течностите или повърхностноактивните вещества в продължение на 10 минути. Използването на друга продължителност на експозицията следва да бъде придружено от подходяща научна обосновка. Моля, вижте допълнение 1 за определение за повърхностноактивно вещество и смес, съдържаща повърхностноактивно вещество.

Твърдите вещества, различни от повърхностноактивни вещества, обикновено се изпитват във вид на разтвори или суспензии при концентрация 20 % w/v в 0,9 % разтвор на натриев хлорид, дестилирана вода или друг разтворител, за който е доказано, че не влияе неблагоприятно върху системата за изпитване. При някои обстоятелства и подходяща научна обосновка твърдите вещества могат да се изпитват и в чист вид чрез пряко прилагане върху повърхността на роговицата, като се използва методът с отворено отделение (вж. точка 32). Роговицата се експонира на твърдите вещества в продължение на четири часа, но както и при течностите и повърхностноактивните вещества, при подходяща научна обосновка може да се приложи и друга продължителност на експозицията.

В зависимост от физичната природа и химичните характеристики на изпитвания химикал могат да се използват различни методи на третиране (напр. твърди вещества, течности, вискозни спрямо невискозни течности). Критичният фактор е да се осигури изпитваният химикал да покрива в достатъчна степен епителната повърхност и да бъде подходящо отстранен при етапите на измиване. Когато изпитваните химикали са невискозни или слабо вискозни течности, обикновено се използва методът със затворено отделение, а когато изпитваните химикали са полувискозни и вискозни течности и твърди вещества в чист вид, обикновено се използва методът с отворено отделение.

При метода със затворено отделение през отворите за дозиране върху горната повърхност в предното отделение се въвежда достатъчно количество от изпитвания химикал (750 µl), така че да покрие епителната страна на роговицата, след което по време на експозицията отворите се затварят със запушалките на отделението. Важно е да се осигури всяка роговица да се експонира на изпитвания химикал в продължение на съответния период от време.

При метода с отворено отделение пръстенът за затваряне на прозореца и стъкленият прозорец от предното отделение се отстраняват преди третирането. Контролата или изпитваният химикал (750 µl или количество от изпитвания химикал, което е достатъчно да покрие напълно роговицата) се прилагат непосредствено върху епителната повърхност на роговицата, като се използва микропипета. Ако при даден изпитван химикал използването на пипета е затруднено, той може да се зареди под налягане в пипета с позитивно изтласкване за улесняване на дозирането. Накрайникът на пипетата с позитивно изтласкване се поставя в накрайника на спринцовката по такъв начин, че материалът да може да бъде зареден под налягане в изтласкващия накрайник. Едновременно с това буталото на спринцовката се натиска, докато буталото на пипетата се изтегля нагоре. Ако на върха на пипетата се появят мехурчета въздух, изпитваният химикал се изважда (изтласква) и процесът се повтаря до запълване на накрайника без въздушни мехури. Ако е необходимо, може да се използва нормална спринцовка (без игла), тъй като тя позволява точно измерване на обема на изпитвания химикал и по-лесното му прилагане върху епителната повърхност на роговицата. След дозирането стъкленият прозорец се поставя отново на предното отделение, за да се затвори системата.

Инкубация след експозиция

След изтичане на времето за експозиция изпитваният химикал, отрицателната контрола или химикалът за положителна контрола се отстранява от предното отделение и епителът се измива с ЕМЕМ (с фенолово червено) най-малко три пъти (или докато не останат видими следи от изпитвания химикал). Средата със съдържание на фенолово червено се използва за измиване, защото може да се наблюдава промяната на цвета на фенолово червено, за да се определи ефективността на измиващите алкални или киселинни изпитвани химикали. Роговиците се измиват повече от три пъти, ако оцветяването на феноловото червено продължава

▼ M7

да е изменено (жълто или пурпурно) или ако още има видими следи от изпитвания химикал. След като изпитваният химикал бъде отстранен от средата, роговиците се измиват за последен път с ЕМЕМ (без фенолово червено). ЕМЕМ (без фенолово червено) се използва за последното измиване, за да се осигури отстраняването на феноловото червено от предното отделение, преди да се направи измерването за непрозрачност. След това предното отделение се пълни отново с прясна среда ЕМЕМ без фенолово червено.

При течности или повърхностноактивни вещества след измиването роговиците се инкубират за още два часа при 32 ± 1 °C. В някои случаи може да е полезно да се удължи времето след експозицията и решението за това може да се вземе според индивидуалния случай. Роговици, третирани с твърди вещества, се измиват старателно в края на четиричасовата експозиция, но не изискват допълнителна инкубация.

В края на инкубационния период след експозицията за течности и повърхностноактивни вещества и в края на четиричасовата експозиция за твърди вещества, различни от повърхностноактивни, се отчитат непрозрачността и пропускливостта на всяка роговица. Също така се прави визуален оглед на всяка роговица и се записват относимите наблюдения (напр. обелване на тъканта, остатъци от изпитвания химикал, неравномерна непрозрачност). Тези наблюдения могат да бъдат важни, тъй като могат да се отразят като колебания в отчетените стойности от измервателното устройство за непрозрачност.

Химикали за контроли

Във всеки опит се включват паралелни отрицателни контроли или контроли на разтворител/носител, и положителни контроли.

Когато се изпитва течна субстанция със 100 % концентрация, в метода за изпитване НППР се включва паралелна отрицателна контрола (напр. 0,9 % разтвор на натриев хлорид или дестилирана вода), за да се позволи откриване на неспецифични промени в изпитваната система и за осигуряване на базова линия за крайните точки на изследването. Също така, тя осигурява проверка, че не се получава неподходящ отклик на дразнене в резултат от неподходящи условия на изследването.

Когато се изпитва разрежена течност, повърхностноактивно вещество или твърдо вещество, в метода за изпитване НППР се включва паралелна контролна група на разтворител/носител, за да се позволи откриване на неспецифични промени в изпитваната система и за осигуряване на базова линия за крайните точки на изследването. Може да се използва само разтворител/носител, за който е доказано, че не влияе неблагоприятно върху изпитваната система.

Химикал, за който е известно, че предизвиква положителен отклик, се включва във всеки опит като паралелна положителна контрола за проверка на целостта на системата за изпитване и правилното му провеждане. Независимо от това, за да се осигури възможността за оценка на варирането на отклика за положителната контрола във времето, големината на отклика на дразнещото действие не следва да е прекомерна.

Примери за положителни контроли за течни изпитвани химикали са 100 % етанол или 100 % диметилформамид. Пример за положителна контрола за твърди изпитвани химикали е 20 % w/v имидазол в 0,9 % разтвор на натриев хлорид.

Химикалите за сравнение са от полза за оценката на потенциала за дразнещо действие върху очите на неизвестни химикали от конкретен клас химикали или продуктово клас, или за оценка на относителния потенциал за дразнещо действие на химикали с дразнещо действие върху очите в рамките на конкретен размах от отклици на дразнене.

Измерени крайни точки

Непрозрачността се определя от количеството светлина, преминало през роговицата. Непрозрачността на роговицата се измерва количествено с помощта на измервателно устройство за непрозрачност, при което се получават стойности за непрозрачността, измерени по непрекъснатата скала.

Пропускливостта се определя от количеството оцветител натриев флуоресцеин, което прониква през всички клетъчни слоеве на роговицата (т.е. от епитела по външната повърхност на роговицата през ендотела по вътрешната повърхност на роговицата). Един ml оцветител натриев флуоресцеин (4 или 5 mg/ml, когато се изпитват съответно течности и повърхностноактивни твърди вещества, или твърди вещества, различни от

▼ **M7**

повърхностноактивни) се поставя в предното отделение на държателя за роговицата, в което се помества епителната страна на роговицата, докато задното отделение, в което се помества ендотелната страна на роговицата, се пълни с прясна ЕМЕМ. След това държателят се инкубира в хоризонтално положение в продължение на 90 ± 5 минути при 32 ± 1 °C. Количеството натриев флуоресцеин, което преминава в задното отделение, се измерва количествено с помощта на UV/VIS спектрофотометър. Спектрофотометричните измервания, оценени при 490 nm, се отчитат като стойности за оптичната плътност (OD_{490}) или за абсорбцията, които се измерват по непрекъснатата скала. Стойностите за пропускливостта на флуоресцеина се определят, като се използват стойностите OD_{490} на базата на спектрофотометър във видимата област, използващ стандартен ход на светлината от 1 cm.

Друга възможност е да се използва четец на 96-гнездна микротитърна плоча, при условие че: i) може да се определи линейният обхват на четца на плочата за определяне на стойностите за флуоресцеин за OD_{490} ; и (ii), в 96-гнездната плоча се постави точният обем проби с флуоресцеин, за да се получат стойности OD_{490} , еквивалентни на еталонната дължина на хода на светлината от 1 cm [това може да изисква гнездата да са пълни докрай (обикновено 360 µl)].

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Оценка на данните**

След като стойностите за непрозрачност и средна пропускливост (OD_{490}) бъдат коригирани спрямо фоновата непрозрачност и стойностите за пропускливост OD_{490} на отрицателната контрола, средните стойности за непрозрачност и пропускливост OD_{490} за всяка третирана група се свързват в една изведена по емпиричен път формула за изчисляване на *in vitro* баловата оценка за дразнещото действие (ИВБОДД) за всяка третирана група както следва:

ИВБОДД = средната стойност на непрозрачност + (15 × средната стойност на пропускливост OD_{490})

Sina *et al.* (16) посочват, че тази формула е изведена по време на вътрешнолабораторни и междулабораторни изследвания. Получените данни в едно многолабораторно изследване за поредица от 36 съединения са били подложени на мултивариантен анализ за определяне на уравнението, което най-добре съгласува данните, получени *in vivo* и *in vitro*. Този анализ е извършен от учени от две отделни компании, които са извели приблизително идентични уравнения.

Стойностите за непрозрачността и пропускливостта следва да се оценяват и независимо, за да се определи дали даден изпитван химикал е предизвикал корозивност или силно дразнене само през една от двете крайни точки (вж. критериите за решението).

Критерии за решението

Граничните стойности на ИВБОДД за идентифициране на изпитвани химикали като предизвикващи сериозно увреждане на очите (категория 1 по GHS на ООН) и изпитвани химикали, които не изискват класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите („без категория“ по GHS на ООН), са посочени по-долу:

ИВБОДД	GHS на ООН
≤ 3	Без категория
$> 3; \leq 55$	Не може да се направи прогноза
> 55	Категория 1

Критерии за приемливост на изпитването

Едно изпитване се смята за приемливо, когато положителната контрола дава ИВБОДД, попадаща в рамките на две стандартни отклонения от текущата средна стойност за предходни изследвания, която следва да се актуализира най-малко на всеки три месеца, или всеки път, когато в лаборатории, в които рядко се провеждат изпитвания (т.е. по-рядко от веднъж месечно), е проведено приемливо изпитване. Отклиците от отрицателната контрола

▼ **M7**

или контролата на разтворител/носител следва да дават резултати със стойности за непрозрачност и пропускливост, които са по-ниски от установените горни граници за стойностите за фоновата непрозрачност и пропускливост за говежда роговица, третирана със съответната отрицателна контрола или контрола на разтворител/носител. Една изпитвана серия, включваща най-малко три роговици, би следвало да е достатъчна за изпитването на даден химикал, когато полученото в резултат от нея класифициране е недвусмислено. Независимо от това, при наличие на гранични резултати в първата изпитвана серия следва (но не е задължително) да се разгледа втора изпитвана серия, както и трета, в случай на несъгласувани резултати за средните стойности на ИВБОДД между първата и втората изпитвана серия. В този контекст резултатът от първата изпитвана серия се смята за граничен, ако прогнозните стойности за 3-те роговици не са съгласувани, така че:

- 2 от 3-те роговици са дали прогнозни стойности, несъгласувани със средната стойност за всички 3 роговици, ИЛИ,
- 1 от 3-те роговици е дала прогнозна стойност, несъгласувана със средната стойност за всички 3 роговици, И несъгласуваният резултат е бил > 10 ИВБОДД единици от граничния праг от 55.
- Ако при повторната изпитвана серия се потвърди прогнозната стойност от първоначалната изпитвана серия (въз основа на средната ИВБОДД стойност), тогава може да се вземе окончателно решение без допълнително изпитване. Ако при повторния аналитичен ход се получи прогнозна стойност, която е несъгласувана със стойността от първоначалния ход (въз основа на средната ИВБОДД стойност), тогава следва да се проведе трети и последен аналитичен ход, за да се вземе решение по отношение на неясните прогнозни стойности и да се класифицира изпитваният химикал. Може да е допустимо да бъдат отказани допълнителните изпитвания за класифициране и етикетиране, в случай че която и да е изпитвана серия доведе до прогнозна стойност за категория 1 по GHS на ООН.

Протокол от изпитването

Протоколът от изпитването следва да включва следната информация, когато тя се отнася за провеждането на изпитването:

Изпитвани химикали и химикали за контроли

- Наименование(-я) на химикала, като например структурното наименование, използвано от Службата за химични индекси CAS, следвано от други наименования, ако са известни; регистрационен номер по CAS (RN), ако е известен;
- Чистота и състав на изпитвания химикал/химикала за контрола (в тегловни проценти), доколкото такава информация е налична;
- Физични и химични свойства, като например агрегатно състояние, летливост, рН, стабилност, клас на химикала, водоразтворимост, относима към провеждането на изследването;
- обработка на изпитвания химикал/химикала за контрола, преди изпитването, ако е приложимо (напр. нагриване, стриване);
- Стабилност, ако е известна.

Информация за финансиращия и за изпитващата лаборатория

- Име и адрес на финансиращия, на изпитващата лаборатория и на ръководителя на изследването;

Условия на метода за изпитване

- Използвано измервателно устройство за непрозрачност (напр. модел и спецификации) и инструментални настройки;
- Информация за калибрирането на устройствата, използвани за измерване на непрозрачността и пропускливостта (напр. измервателно устройство за непрозрачност и спектрофотометър), за да се осигури линейност на измерванията;
- Тип на използваните държатели за роговица (напр. модел и спецификации);

▼ M7

- Описание на друго използвано оборудване;
- Процедурата, използвана за осигуряване на цялостност (напр. точност и надеждност) на метода за изпитване във времето (напр. периодично изпитване на химикали за изпитване за пригодност).

Критерии за приемливост на изпитването

- Приемлив размах за паралелните положителни и отрицателни контроли, въз основа на данни от предходни изпитвания;
- Ако е приложимо, приемлив размах за паралелни контроли с химикали за сравнение, въз основа на данни от предходни изпитвания.

Пробовземане и приготвяне на очите

- Идентификация на източника на очите (напр. кланицата, където са пробовзети);
- Диаметър на роговицата като мярка на възрастта на животното и пригодност за изследването;
- Условия на съхранение и транспортиране на очите (напр. дата и час на пробовземане на очите, период от време преди започване на изпитването, среда и температурни условия, в които са транспортирани, всякакви използвани антибиотици);
- Приготвяне и поставяне на говеждите роговици, включително декларация за качеството им, температурата на държателите за роговица и критериите за подбор на роговица, използвани за изпитването.

Процедура за изпитване

- Брой на повторенията;
- Идентичност на използваните отрицателни и положителни контроли (ако е приложимо, също и на разтворителя и на контролите с химикали за сравнение);
- Концентрация (концентрации) на изпитвания химикал, прилагане, използвано време на експозиция и инкубационен период след експозицията;
- Описание на използваните критерии за оценка и за решение;
- Описание на използваните критерии за приемливост на изследването.
- описание на всякакви изменения на процедурата за изпитване;
- Описание на използваните критерии за решение.

Резултати

- Представяне в табличен вид на данните за отделни изпитвани проби (напр. стойности за непрозрачност и OD490, изчислени ИВБОДД за изпитвания химикал, положителната, отрицателната контрола и контролите с химикали за сравнение (ако са включени), протоколирани в табличен вид, включително данни от повторенията на опити, когато е подходящо, и средни стойности \pm стандартното отклонение за всеки опит);
- Описание на други наблюдавани ефекти;
- Полученото *in vitro* класифициране, ако е приложимо.

*Обсъждане на резултатите.**Заклучение*

▼ M7

ЛИТЕРАТУРА

- (1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report — *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. На разположение на адрес: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm.
- (2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. На разположение на адрес: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
- (3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.
- (4) UN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: United Nations. На разположение на адрес: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.
- (5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1-9.
- (6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report — *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. На разположение на адрес: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm.
- (7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. На разположение на адрес: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
- (8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay — SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).
- (9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.
- (10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.
- (11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. На разположение на адрес: [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].

▼ M7

- (12) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
- (13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Adopted October 25, 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- (14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.
- (15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on — Part I. *The Lancet* 349: 636-641.
- (16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.
- (17) Глава Б.5 от настоящото приложение, Остра токсичност: очно дразнещо/корозивно действие.
- (18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. На разположение на адрес: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].
- (19) OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997).

На разположение на адрес: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼ **M7**

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: степента на близост между резултатите от метода за изпитване и приетите референтни стойности. Това е мярка за характеристиките на метода за изпитване и аспект на „относимостта“. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съответствие“, за да се обозначи относителният дял на правилните резултати при даден метод за изпитване.

Химикал за сравнение: Химикал, използван като еталон за сравнение с изпитван химикал. Химикалът за сравнение следва да притежава следните свойства: i) постоянен и надежден източник (или източници); ii) структурно и функционално сходство с класа на изпитваните химикали; iii) известни физични/химични характеристики; iv) потвърждаващи данни за известни въздействия; и v) известен потенциал в рамките на размаха на желаниа отклик.

Подход „отдолу нагоре“: поетапен подход, използван за химикали, за които се предполага, че не се изисква класифициране за дразнене или сериозно увреждане на очите, който започва с определяне на химикали, за които не се изисква класифициране (отрицателни резултати) по отношение на други химикали (положителен резултат).

Химикал: Вещество или смес.

Роговица: Прозрачната част на предната страна на очната ябълка, която покрива ириса и зеницата и пропуска светлината навътре.

Непрозрачност на роговицата: Мярка за степента на непрозрачност на роговицата след експозиция на изпитвания химикал. Повишената непрозрачност на роговицата е показател за увреждане на роговицата. Непрозрачността може да се оценява субективно, както това се извършва в изпитването на Draize със заешки очи, или обективно с инструмент, като „измервателно устройство за непрозрачност“.

Пропускливост на роговицата: Количествена мярка за увреждане на епитела на роговицата чрез определяне на количеството оцветител натриев флуоресцеин, преминаващо през всички клетъчни слоеве на роговицата.

Дразнене на очите: Предизвикване на промени в очите вследствие на прилагане на изпитван химикал към предната повърхност на окото, които са напълно обратими в рамките на 21 дни след прилагането. Терминът е взаимозаменяем с „Обратими ефекти върху очите“ и с „Категория 2 по GHS на ООН“ (4).

Процент неверни отрицателни резултати: Делът на всички положителни химикали, невярно определени като отрицателни по даден метод за изпитване. Това е един от показателите за характеристиките на метода за изпитване.

Процент неверни положителни резултати: Делът на всички отрицателни химикали, невярно определени като положителни по даден метод за изпитване. Това е един от показателите за характеристиките на метода за изпитване.

Опасност: Вътрешноприсъщо свойство на даден агент или ситуация, притежаващ потенциал да предизвика неблагоприятни ефекти, когато организмът, система или (суб-)популация бъдат експонирани на този агент.

In vitro балова оценка за дразнещо действие (ИВБОДД): Емпирично получена формула, използвана в метода за изпитване НППР, при която средните стойности за непрозрачността и пропускливостта за всяка третирана група се комбинират в една *in vitro* балова оценка за всяка третирана група. ИВБОДД = средната стойност за непрозрачност + (15 × средната стойност за пропускливост).

Необратими въздействия върху очите: Вж. „сериозно увреждане на очите“.

▼ M7

Смес: Смес или разтвор, съставен от две или повече вещества, в която или който те не си взаимодействат (4).

Отрицателна контрола: Нетретирано повторение, съдържащо всички компоненти на дадена изпитвана система. Тази проба се обработва с пробите, третирани с изпитвания химикал, и с други контролни проби, за определяне дали разтворителят взаимодейства с изпитваната система.

Некласифицирани: химикали, които не са класифицирани за дразнене на очите (категория 2, 2A или 2B по GHS на ООН) или сериозно увреждане на очите (категория 1 по GHS на ООН). Терминът е взаимозаменяем с „без категория по GHS на ООН“.

Измервателно устройство за непрозрачност: Инструмент, използван за измерване на „непрозрачността на роговицата“ чрез количествена оценка на пропусканата през роговицата светлина. Типичният инструмент има две отделения, всяко със свой собствен светлинен източник и фотоклетка. Едното отделение се използва за третираната роговица, а другото се използва за калибриране и нулиране на инструмента. Светлината от халогенна лампа се изпраща през едно контролно отделение (празно отделение без прозорци или течност) към фотоклетка и се сравнява със светлината, изпращана към фотоклетка през опитното отделение, в което се намира отделението с роговицата. Разликата в пропусканата светлина от фотоклетките се сравнява и на цифров екран се изписва цифровата стойност за непрозрачността.

Положителна контрола: Повторение, съдържащо всички компоненти на дадена изпитвана система, и третирано с химикал, за който е известно, че предизвиква положителен отклик. За да се гарантира, че може да се направи оценка на варирането на отклика в положителната контрола във времето, големината на положителния отклик не следва да е прекомерна.

Обратими въздействия върху очите: Вж. „Дразнене на очите“.

Надеждност: мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да се приложи възпроизводимо в една и съща лаборатория и в различни лаборатории по различно време, при използване на един и същи протокол. Оценката за нея се прави, като се изчислява вътрешнолабораторната и междулабораторната възпроизводимост и вътрешнолабораторната повторемост.

Сериозно увреждане на очите: Предизвикване на тъканно увреждане на окото или сериозно физическо влошаване на зрението след прилагане на изпитван химикал към предната повърхност на окото, което не е напълно обратимо в рамките на 21 дни след прилагането. Терминът е взаимозаменяем с „Необратими ефекти върху очите“ и с „Категория 1 по GHS на ООН“ (4).

Контрола на разтворител/носител: Нетретирана проба, съдържаща всички компоненти на дадена изпитвана система, включително разтворителя или носителя, която се обработва с пробите, третирани с изпитвания химикал, и с други контролни проби, за определяне на базовия отклик при пробите, третирани с изпитвания химикал, разтворен в същия разтворител или носител. Когато се изпитва с паралелна отрицателна контрола тази проба показва също дали разтворителят или носителят взаимодействат с изпитваната система.

Вещество: химичен елемент и неговите съединения в естествено състояние или получени чрез всеки производствен процес, включително всяка добавка, необходима за запазване на стабилността на продукта и всеки примес, извлечен от използвания процес, с изключение на всеки разтворител, който може да бъде отделен, без да се засяга стабилността на веществото или да се променя неговият състав (4).

▼ M7

Повърхностноактивно вещество: също така наречено повърхностно-активен агент, представлява вещество, като например детергент, което е в състояние да намали повърхностното напрежение на дадена течност и по този начин да позволи образуването на пяна в течността, или проникването ѝ в твърди вещества; Известно е също като мокрител.

Смес, съдържаща повърхностноактивно вещество: в контекста на настоящия метод за изпитване това е смес, съдържаща едно или повече повърхностноактивни вещества при крайна концентрация > 5 %.

Подход „отгоре надолу“: поетапен подход, използван за химикал, за който се предполага, че предизвиква сериозно увреждане на очите, който започва с определяне на химикали, предизвикващи сериозно увреждане на очите (положителен резултат), по отношение на други химикали (отрицателен резултат).

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

Стратегия за поетапно изпитване: стратегия за поетапно изпитване, при която цялата съществуваща информация за даден изпитван химикал се разглежда по конкретен ред, като на всеки етап се прилага процес, основан на тежестта на доказателствата, за определяне дали съществува достатъчно информация за вземане решение за класифициране с оглед на опасността, преди да се премине към следващия етап. Ако потенциалът за дразнещо действие на даден изпитван химикал може да се определи въз основа на съществуващата информация, не се налага допълнително изпитване. Ако потенциалът за дразнещо действие на даден изпитван химикал не може да се определи въз основа на съществуващата информация, се провежда процедура за поетапно последователно изпитване върху животни, докато стане възможно да се направи ясно класифициране.

Глобална хармонизирана система на Организацията на обединените нации за класифициране и етикетирание на химикали (GHS на ООН): система, предлагаща класифициране на химикали (вещества и смеси) според стандартизирани видове и степени на физическа, здравна и екологична опасност и разглеждаща съответни съобщителни елементи, като например пиктограми, сигнални думи, предупреждения за опасност, препоръки за безопасност и информационни листовки за безопасност, така че те да съобщават информация за тяхното неблагоприятно въздействие с оглед защита на хората (включително работодатели, работещи, служители в транспорта, потребители и аварийни служители) и на околната среда (4).

Категория 1 по GHS на ООН: Вж. „Сериозно увреждане на очите“.

Категория 2 по GHS на ООН: Вж. „Дразнене на очите“.

„Без категория“ по GHS на ООН: Химикали, които не отговарят на изискванията за класифициране като категория 1 или 2 (2A или 2B) по GHS на ООН. Терминът е взаимозаменяем с „некласифицирани“.

Валидиран метод за изпитване: метод за изпитване, за който са извършени изследвания за валидиране за определяне на относимостта (включително на точността) и надеждността му за конкретна цел. Важно е да се отбележи, че характеристиките на един валидиран метод за изпитване може да не са достатъчни по отношение на точността и надеждността, за да се счита той за приложим за предлаганата цел.

Процес, основан на тежестта на доказателствата: Процесът на отчитане на силните и слабите страни на различни видове информация за достигане до дадено заключение относно потенциалната опасност на даден изпитван химикал, и в подкрепа на това заключение.

▼M7

Допълнение 2

КАПАЦИТЕТ ЗА ПРОГНОЗИРАНЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ НПГР

Таблица 1

Прогнозен капацитет на НПГР за идентифициране на химикали, предизвикващи сериозно увреждане на очите [категория 1 по GHS на ООН/Регламент CLP на ЕС спрямо различни от категория 1 (категория 2 + без категория); категория I по ЕРА на САЩ спрямо различни от категория I (категория II + категория III + категория IV)]

Класиране Система	№	Точност		Чувствителност		Неверни отрицателни		Специфичност		Неверни положителни	
		%	№	%	№	%	№	%	№	%	№
GHS на ООН Регламент CLP на ЕС	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
ЕРА на САЩ	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Таблица 2

Прогнозен капацитет на НПГР за идентифициране на химикалите, които не изискват класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите („химикали, които не са с дразнещо действие“) [„без категория“ по GHS на ООН/Регламент CLP на ЕС спрямо различни от „без категория“ (категория I + категория 2); категория IV по ЕРА на САЩ спрямо различни от категория IV (категория I + категория II + категория III)]

Класиране Система	№	Точност		Чувствителност		Неверни отрицателни		Специфичност		Неверни положителни	
		%	№	%	№	%	№	%	№	%	№
GHS на ООН Регламент CLP на ЕС	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
ЕРА на САЩ	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼M7

Допълнение 3

ХИМИКАЛИ ЗА ИЗПИТВАНЕ ЗА ПРИГОДНОСТ ЗА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ НППР

Преди рутинното използване на настоящия метод за изпитване, лабораториите следва да докажат техническата си компетентност като правилно определят класификацията за опасност за 13-те химикала, препоръчани в Таблица 1. Тези химикали са подбрани да представляват размаха на отклите за опасности за очите, въз основа на резултати от изпитването *in vivo* със заешки очи (TG 405) и системата за класифициране GHS на ООН (т.е. категории 1, 2A, 2B, или неклассифицирани) (4). Други критерии за подбор са били това, че химикалите са налични в търговската мрежа, че са налични висококачествени *in vivo* референтни данни и че са налични висококачествени *in vitro* данни от метода за изпитване НППР. Референтни данни са дадени в рационализиращия обобщаващ документ (3) и в документа на ICCVAM за контекстуален преглед за метода за изпитване НППР (2) (18).

Таблица 1

Препоръчвани химикали за доказване на техническа компетентност по отношение на метода за изпитване НППР

Химикал	CASRN	Химичен клас (1)	Агрегатно състояние:	<i>In vivo</i> класифициране (2)	Класифициране НППР
Бензалкониев хлорид (5 %)	8001-54-5	Ониево съединение	Течност	Категория 1	Категория 1
Хлорхексидин	55-56-1	Амин, Амидин	Твърдо	Категория 1	Категория 1
Дибензоил-L-винена киселина	2743-38-6	Карбоксилна киселина, естер	Твърдо	Категория 1	Категория 1
Имидазол	288-32-4	Хетероциклено	Твърдо	Категория 1	Категория 1
Трихлорооцетна киселина (30 %)	76-03-9	Карбоксилна киселина	Течност	Категория 1	Категория 1
2,6-Дихлоробензоил-хлорид	4659-45-4	Ацилов халид	Течност	Категория 2A	Не може да се направи точна/надеждна прогноза
Етил-2-метилацетоецетат	609-14-3	Кетон, естер	Течност	Категория 2B	Не може да се направи точна/надеждна прогноза
Амониев нитрат	6484-52-2	Неорганична сол	Твърдо	Категория 2 (3)	Не може да се направи точна/надеждна прогноза
EDTA, дикалиева сол	25102-12-9	Амин, карбоксилна киселина (сол)	Твърдо	Неклассифицирано	Неклассифицирано
Tween 20	9005-64-5	Естер, полиетер	Течност	Неклассифицирано	Неклассифицирано
2-меркаптопиримидин	1450-85-7	Ацилов халид	Твърдо	Неклассифицирано	Неклассифицирано
Фенилбутазон	50-33-9	Хетероциклено	Твърдо	Неклассифицирано	Неклассифицирано

▼ M7

Химикал	CASRN	Химичен клас ⁽¹⁾	Агрегатно състояние:	<i>In vivo</i> класифициране ⁽²⁾	Класифициране НПГР
Полиоксетилен 23 лаурилов етер (BRJ-35) (10 %)	9002-92-0	Алкохол	Течност	Некласифицирано	Некласифицирано

Съкращения: CASRN = Номер по Служба за химични индекси CAS

⁽¹⁾ за всеки изпитван химикал са определени химични класове, като за целта се използва стандартна схема за класификация, базираща се на системата за класификация MeSH (National Library of Medicine Medical Subject Headings) (на разположение на адрес: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Базира се на резултати от *in vivo* изпитването със заешки очи (ОИСП TG 405) (17) и с използване на GHS на ООН (4).

⁽³⁾ Класифицирането като 2A или 2B зависи от тълкуването на критерия от GHS на ООН за разграничаване между тези две категории, т.е. 1 от 3 спрямо 2 от 3 животни с ефекти в ден 7 са необходими за класифициране в категория 2A. Изследването *in vivo* е включвало 3 животни. Всички крайни точки, с изключение на зачервяване на конюнктивата при едно животно, са възстановени до оценка нула към ден 7 или по-рано. Едното животно, което не се е възстановило напълно до ден 7, е имало зачервяване на конюнктивата с оценка 1 (в ден 7), което се е възстановило напълно в ден 10.

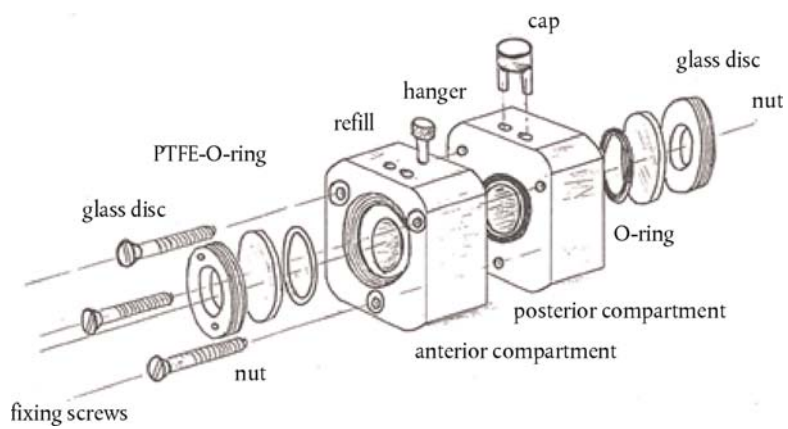
ДЪРЖАТЕЛ ЗА РОГОВИЦА ЗА НПГР

Държателите за роговицата за НПГР са изработени от инертен материал (напр. полипропилен). Държателите се състоят от две половини (предно и задно отделение) и имат две сходни цилиндрични вътрешни отделения. Всяко отделение е проектирано с вместимост около 5 ml и завършва със стъклен прозорец, през който се записват измерванията за непрозрачност. Всяко от вътрешните отделения е с диаметър 1,7 cm и дълбочина 2,2 cm ⁽¹⁾. За да се избегнат течове се използва O-пръстен, разположен върху задното отделение. Роговиците се поставят с ендотелната страна надолу върху O-пръстена на задните отделения, а предните отделения се поставят върху епителната страна на роговиците. Отделенията се закрепват с три винта от неръждаема стомана, разположени по външните краища на отделението. В края на всяко отделение се намира стъклен прозорец, който може да се отстранява за улесняване на достъпа до роговицата. Между стъкления прозорец и отделението също е поставен O-пръстен за защита от течове. Два отвора върху горната страна на всяко отделение позволяват поставяне и отстраняване на средата и на изпитваните химикали. По време на третирането и инкубацията те се затварят с гумени капачки. Светлопреминаването през държателите за роговицата потенциално може да се промени, тъй като последиците от износването или натрупването на специфични остатъци от химикал по вътрешните отвори на отделението или по стъклените прозорци могат да засегнат разсейването или отразяването на светлината. Това би могло да доведе до увеличаване или намаляване на базовото светлопреминаване (и обратно, на базовите отчетени стойности за непрозрачност на роговицата) през държателите на роговицата, и може да бъде ясно изразено като забележими промени в очакваните базови първоначални измервания на непрозрачността на роговицата в отделните отделения (т.е. стойности на първоначалната непрозрачност на роговицата в отделни държатели за роговица могат рутинно да се различават с повече от 2 или 3 единици непрозрачност от очакваните базови стойности). Всяка лаборатория следва да разгледа възможността за създаване на програма за оценка на промяната на светлопреминаването през държателите за роговица, в зависимост от естеството на изпитваните химикали и честотата на използване на отделенията. За установяването на базови стойности, държателите за роговица могат да бъдат проверени преди рутинното използване чрез измерване на базовите стойности за непрозрачност (или светлопреминаване) за отделенията, напълнени с комплектен носител, без роговици. След това държателите за роговица се проверяват периодично за промени в светлопреминаването по време на периодите на използване. Всяка лаборатория може да определи честотата на проверките на държателите за роговица въз основа на изпитваните химикали, честотата на използване и наблюденията на промените в базовите стойности за непрозрачност на роговицата. Ако се наблюдават забележими промени в светлопреминаването през държателите за роговица, трябва да се вземат предвид подходящи процедури за почистване и/или полиране на вътрешната повърхност на държателите за роговица, или замяна.

⁽¹⁾ Дадените размери са за държател на роговица, използван за крави на възраст между 12 и 60 месеца. В случай че се използват животни на възраст от 6 до 12 месеца, държателят ще трябва да се конструира така, че всяко отделение да е с вместимост 4 ml, а всяко от вътрешните отделения да е с диаметър 1,5 cm и дълбочина 2,2 cm. При всяка нова конструкция за държател за роговица е важно съотношението между експонираната повърхностна площ на роговицата и обема на задното отделение да се запази както при традиционния държател. Това е необходимо, за да се гарантира стойностите за пропускливост да бъдат правилно определени за изчисляването на ИВБОДД по предлаганата формула.

▼ M7

Държател за роговица: перспективно изображение в разглобен вид



▼ M7

Допълнение 5

ИЗМЕРВАТЕЛНОТО УСТРОЙСТВО ЗА НЕПРОЗРАЧНОСТ

Измервателното устройство за непрозрачност е инструмент за измерване на светлопреминаването. Например, при оборудването ОР-КИТ от Electro Design (Riom, Франция), използвано за валидиране на метода за изпитване НППР, светлината от халогенна лампа се изпраща през едно контролно отделение (празно отделение без прозорци или течност) към фотоклетка и се сравнява със светлината, изпращана към фотоклетка през опитното отделение, в което се намира отделението с роговицата. Разликата в светлопреминаването от фотоклетките се сравнява и на цифров екран се изписва цифровата стойност за непрозрачността. Определят се единиците за непрозрачност. Други видове измервателни устройства за непрозрачност, с различна структура (напр. не се изисква извършване на успоредни измервания на контролно и опитно отделение) могат да се използват, ако е доказано, че дават резултати, подобни на валидираното оборудване.

Измервателното устройство за непрозрачност следва да дава линеен отклик в обхват от отчетени стойности за непрозрачността, който обхваща граничните стойности, използвани за различните класификации, описани в Прогнозния модел (т.е. до граничната стойност, която определя корозивно-то/силно дразнещото действие). За да се гарантират линейни и точни отчетени стойности до 75-80 единици непрозрачност, необходимо е измервателното устройство за непрозрачност да се калибрира, като се използва серия от калибратори. Калибраторите се поставят в калибриращото отделение (отделение за роговицата, предназначено за поставяне на калибраторите) и се отчитат с измервателното устройство за непрозрачност. Калибриращата камера е предвидена да помества калибраторите на приблизително същото разстояние между източника на светлината и фотоклетката, на което се разполагат роговиците по време на измерването за непрозрачност. Референтните стойности и точката на първоначално настройване зависят от вида на използваното оборудване. Линейността на измерванията на непрозрачността следва да бъде осигурена чрез подходящи процедури (специфични за инструмента). Например, при оборудването ОР-КИТ от Electro Design (Riom, Франция), измервателното устройство за непрозрачност най-напред се калибрира за 0 единици непрозрачност, като се използва калибриращото отделение без калибратор. След това в калибриращото отделение последователно се поставят три различни калибратора и се измерва непрозрачността. Калибратори 1, 2 и 3 следва да дават отчетени стойности за непрозрачността, равни на зададените им, съответно 75, 150, и 225 единици $\pm 5\%$.

▼ M7

Б.48. МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ С ИЗОЛИРАНИ ПТИЧИ ОЧИ ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА I) ХИМИКАЛИ, ПРЕДИЗВИКВАЩИ СЕРИОЗНО УВРЕЖДАНЕ НА ОЧИТЕ, И II) ХИМИКАЛИ, КОИТО НЕ ИЗИСКВАТ КЛАСИФИЦИРАНЕ ЗА ДРАЗНЕНЕ НА ОЧИТЕ ИЛИ СЕРИОЗНО УВРЕЖДАНЕ НА ОЧИТЕ

ВЪВЕДЕНИЕ

Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 438 (2013). Методът за изпитване с изолирани птичи очи (ИПО) е оценен през 2006 и 2010 г. от Междуведомствения координационен комитет за валидиране на алтернативни методи (ICCVAM), съвместно с Европейския център за валидиране на алтернативни методи (ECVAM) и Японския център за валидиране на алтернативни методи (JaCVAM) (1) (2) (3). В първата оценка методът за изпитване с ИПО е бил одобрен като научно валиден метод за изпитване за използване като скринингово изпитване за идентифициране на химикали (вещества и смеси), предизвикващи сериозно увреждане на очите (категория 1), определено в Глобалната хармонизирана система на Организацията на обединените нации (ООН) за класифициране и етикетиране на химикали (GHS) (1) (2) (4) и в Регламент (ЕО) № 1272/2008 относно класифицирането, етикетирането и опаковането на вещества и смеси (CLP) ⁽¹⁾. Във втората оценка методът за изпитване с ИПО е оценен по отношение на използването му като скринингово изпитване за идентифициране на химикали, които не са класифицирани за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите, както е определено в GHS на ООН (3) (4). Резултатите от изследването за валидиране и препоръките на експертната група за партньорската проверка подкрепиха първоначалната препоръка за използване на ИПО за класифициране на химикали, предизвикващи сериозно увреждане на очите (категория 1 по GHS на ООН), като наличната база данни не се е променила след първоначалното валидиране от ICCVAM. На този етап няма предложени допълнителни препоръки за разширяване на областта на приложимост на ИПО с оглед включване и на други категории. Бе извършена повторна оценка на *in vitro* и *in vivo* данните, използвани в изследването за валидиране, с акцент върху оценка на полезността на ИПО за идентифициране на химикали, които не изискват класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите (5). Повторната оценка заключи, че методът за изпитване с ИПО може да се използва за идентифициране на химикали, които не изискват класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите, както е определено в GHS на ООН (4) (5). Настоящият метод за изпитване обхваща препоръчителното използване и ограниченията на метода за изпитване с ИПО въз основа на тези оценки. Основните разлики между първоначалния вариант от 2009 г. и актуализираната версия от 2013 г. на Насоките за изпитване на ОИСП включват използването на метода за изпитване с ИПО за идентифициране на химикали, за които не се изисква класифициране съгласно системата за класифициране GHS на ООН, актуализиране на елементите на протокола от изпитването, актуализиране на допълнение 1 относно определенията и актуализиране на допълнение 2 за химикалите за изпитването за пригодност, но не се ограничават до тях.

Понастоящем е общоприето, че в обозримо бъдеще, нито едно изпитване *in vitro* за дразнене на очите няма да е в състояние да замени изпитването *in vivo* на Draize за действие върху очите при прогнозирането в целия спектър на дразнене, за различните класове химикали. При все това стратегическите комбинации от няколко алтернативни методи за изпитване в рамките на стратегия за (поетапно) изпитване може да са в състояние да заменят изпитването на Draize за действие върху очите (6). Подходът „отгоре надолу“ (7) е създаден да се използва когато въз основа на съществуваща информация за даден химикал се очаква висок потенциал за дразнещо действие, а подходът „отдолу-нагоре“ (7) е създаден да се използва когато въз основа на съществуващата информация за даден химикал се очаква, че няма да причини дразнене на очите, достатъчно за да се изисква класифициране. Методът за изпитване с ИПО е метод за изпитване *in vitro*, който може да се използва при определени обстоятелства и със специфични ограничения, както е описано в точки 8 и 10, за класифициране и етикетиране на химикали за опасност за очите. Въпреки че не се смята за валиден като

⁽¹⁾ Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 г. относно класифицирането, етикетирането 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).

▼ M7

самостоятелен заместител на изпитването *in vivo* върху очи на зайци, методът за изпитване с ИПО се препоръчва като първоначална стъпка в рамките на стратегия за изпитване, като например подхода „отгоре надолу“, предложен от Scott et al. (7) за идентифициране на химикали, предизвикващи сериозно увреждане на очите, т.е. химикали, които следва да бъдат класифицирани като категория 1 по GHS на ООН без по-нататъшно изпитване (4). Методът за изпитване с ИПО се препоръчва и за идентифициране на химикали, които не изискват класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите, както е определено от GHS на ООН („без категория“, NC) (4) и следователно може да се използва като първоначална стъпка в рамките на стратегия за изпитване, основана на подход „отдолу нагоре“ (7). Независимо това, даден химикал, за който не се прогнозира, че причинява сериозно увреждане на очите или не е класифициран за дразнене на очите/сериозно увреждане на очите с метода за изпитване с ИПО, изисква допълнително изпитване (*in vitro* и/или *in vivo*) за определяне на окончателно класифициране. Освен това, съответните регулаторни органи следва да бъдат консултирани преди изпитването на ИПО при подход „отдолу нагоре“ по схеми за класифициране, различни от GHS на ООН.

Целта на настоящия метод за изпитване е да се опишат процедурите, използвани за оценка на потенциалната опасност за очите на изпитвания химикал, измерена чрез способността му да предизвиква или не токсичност в извадени птичи очи. Токсичният ефект върху роговицата се измерва чрез: i) качествена оценка на непрозрачността, ii) качествена оценка на увреждането на епитела при прилагане върху окоето на флуоресцеин (задържане на флуоресцеин), iii) количествено измерване на увеличената дебелина (подуване), и iv) качествена оценка на макроскопичните морфологични увреждания по повърхността. Оценките за непрозрачност, подуване и увреждане на роговицата след експозиция на изпитвания химикал се определят поотделно, след което се комбинират, за да се направи класифициране за дразнещо действие върху очите.

Определенията са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Този метод за изпитване се базира на протокола, предложен в Ръководство № 160 на ОИСП (8), разработен след международното изследване за валидиране на ICCVAM (1) (3) (9), за което принос имаха Европейският център за валидиране на алтернативни методи, Японският център за валидиране на алтернативни методи и „TNO Качество на живот“, департамент „Токсикология и приложна фармакология“ (Холандия). Протоколът се базира на информация, получена от публикувани протоколи, както и на текущия протокол, използван от TNO (10) (11) (12) (13) (14).

При валидирането на настоящия метод за изпитване, на изпитване е била подложена широка гама от химикали, като емпиричната база данни на изследването за валидиране е наброявала 152 химикала, включително 72 вещества и 80 смеси (5). Настоящият метод за изпитване е приложим за твърди вещества, течности, емулсии и гелове. Течностите може да са на водна или друга основа; твърдите вещества може да са разтворими или неразтворими във вода. Газовете и аерозолите все още не са оценени с изследване за валидиране (24).

Методът за изпитване с ИПО може да се използва за идентифициране на химикали, предизвикващи сериозно увреждане на очите, т.е. химикали, които следва да бъдат класифицирани като категория 1 по GHS на ООН (4). Когато се използва за тази цел, установените ограничения на този метод за изпитване се базират на високите проценти неверни положителни резултати за алкохоли и високите проценти неверни отрицателни резултати за твърди и повърхностноактивни вещества (1) (3) (9). Независимо от това, процентите неверни положителни резултати в този контекст (химикали от категория 1 по GHS на ООН, идентифицирани като химикали, които не са от категория 1 по GHS на ООН), не са от критично значение, тъй като всички изпитвани химикали, за които се получават отрицателни резултати, след това ще бъдат изпитвани с друго достатъчно валидирано *in vitro* изпитване или изпитвания или, като последна възможност, върху зайци, в зависимост от регулаторните изисквания, като се прилага стратегия за последователно изпитване с подход, основан на тежестта на доказателствата. Следва да се отбележи, че твърдите вещества могат да доведат до

▼ M7

променливи и екстремни условия на експозиция в *in vivo* изпитването на Draize за дразнещо действие върху очите, което може да доведе до неотнoсими прогнози на техния действителен дразнещ потенциал (15). Изследователите биха могли да разгледат възможността за използване на този метод за изпитване за всякакви типове химикали, при които положителен резултат следва да се приеме за показател за сериозно увреждане на очите, т.е. класифициране като категория 1 по GHS на ООН без по-нататъшно изпитване. Независимо от това, положителни резултати, получени при алкохоли, следва да се тълкуват предпазливо, поради риск от свръхпрогнозиране.

Когато методът за изпитване с ИПО се използва за идентифициране на изпитвани химикали като предизвикващи сериозно увреждане на очите (категория 1 по GHS на ООН), той е с обща точност от 86 % (120/140), процент неверни положителни резултати 6 % (7/113), и процент неверни отрицателни резултати 48 % (13/27), в сравнение с данните от метода *in vivo* за изпитване върху очи на зайци, класифицирани според системата за класифициране GHS на ООН (4) (5).

Методът за изпитване с ИПО може също така да се използва за идентифициране на химикали, които не изискват класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите по системата за класифициране GHS на ООН (4). Съответните регулаторни органи следва да бъдат консултирани преди използването на ИПО при подход „отдолу нагоре“ по други схеми за класифициране. Този метод за изпитване може да се използва за всякакви типове химикали, при които може да се приеме при отрицателен резултат химикалът да не се класифицира за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите. Независимо от това, въз основа на един резултат от базата данни от валидирането, прогнозните стойности за съдържащи органичен разтворител противообращаващи бои могат да бъдат подценени (5).

Когато методът за изпитване с ИПО се използва за идентифициране на химикали, които не изискват класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите, той е с обща точност от 82 % (125/152), процент неверни положителни резултати 33 % (26/79), и процент неверни отрицателни резултати 1 % (1/73), в сравнение с данните от метода *in vivo* за изпитване върху очи на зайци, класифицирани според системата за класифициране GHS на ООН (4) (5). Когато изпитвани химикали от определени класове (т.е. съдържащи органичен разтворител противообращаващи бои) бъдат изключени от базата данни, методът за изпитване с ИПО е с обща точност от 83 % (123/149), процент неверни положителни резултати 33 % (26/78) и процент неверни отрицателни резултати 0 % (0/71) за системата за класифициране GHS на ООН (4) (5).

Методът за изпитване с ИПО не се препоръчва за идентифицирането на изпитваните химикали, които следва да бъдат класифицирани като дразнещи за очите (т.е. категория 2 или категория 2A по GHS на ООН) или на изпитваните химикали, които следва да бъдат класифицирани като леко дразнещи за очите (категория 2B по GHS на ООН) поради значителния брой химикали от категория 1 по GHS на ООН, класифицирани на по-ниско ниво като химикали от категория 2, 2A или 2B по GHS на ООН, или химикали „без категория“ по GHS на ООН, класифицирани на по-високо ниво като химикали от категория 2, 2A или 2B по GHS на ООН. За тази цел може да се изисква допълнително изпитване с друг подходящ метод.

Всички процедури с птичи очи следва да съответстват на приложимите за изпитващата лаборатория разпоредби и процедури за работа с материали с хуманен или животински произход, които включват тъкани и тъканна течност, но не се ограничават само с тях. Препоръчва се спазването на универсалните лабораторни предпазни мерки (16).

Въпреки че методът за изпитване с ИПО не разглежда уврежданията на конюнктивата и ириса, както са оценени в метода за изпитване за дразнещо действие върху очи на зайци, той се отнася до въздействието върху роговицата, на което основно се базира класифицирането *in vivo*, когато се взема предвид Глобалната хармонизирана система на ООН за класифициране. Също така, въпреки че с метода за изпитване с ИПО не

▼ **M7**

може да се направи оценка на обратимостта на уврежданията върху роговицата сама по себе си, бе предложено въз основа на изследванията върху заешки очи оценката за първоначалната дълбочина на увреждането на роговицата да се използва за идентифицирането на някои типове необратимо действие (17). В частност, необходими са нови научни познания, за да се разбере как настъпват необратимите ефекти, които не са свързани с първоначално високо равнище на увреждане. В заключение, методът за изпитване с ИПО не позволява да се направи оценка на потенциала за обща токсичност, свързан с експозицията на очите.

Настоящият метод за изпитване ще бъде актуализиран периодично при вземане под внимание на нова информация и данни. Например, хистопатологията може потенциално да е от полза при необходимост от по-пълна характеристика на увреждането на роговицата. Потребителите се насърчават да съхранят очите и да приготвят хистопатологични образци, които могат да се използват за разработването на база данни и критерии за вземане на решение, които могат допълнително да подобрят точността на настоящия метод за изпитване. ОИСР е разработила ръководство за прилагането на *in vitro* методи за изпитване на токсичност върху очите, което съдържа подробни процедури за вземане на хистопатологични проби, както и информация за това къде да бъдат предадени екземплярите и/или хистопатологичните данни (8).

Всяка лаборатория, която започва да извършва това изследване за първи път, следва да използва химикалите за изпитването за пригодност, посочени в Допълнение 2. Лабораториите могат да използват тези химикали за доказване на своята техническа компетентност за прилагане на метода за изпитване с ИПО преди предаване на данните от ИПО за целите на регулаторното класифициране според степента на опасност.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

Методът за изпитване с ИПО е органотипен модел, който осигурява краткотрайно поддържане на птичето око *in vitro*. При този метод за изпитване увреждането, причинено от изпитвания химикал, се оценява посредством определяне на подуването, непрозрачността и задържането на флуоресценци от роговицата. Докато последните два параметъра се оценяват качествено, анализът на подуването на роговицата се извършва количествено. Всяко измерване се преобразува в количествен резултат, който се използва за изчисляване на общ коефициент на дразнимост, или му се дава качествена категоризация, използвана за *in vitro* класифициране за опасност за очите като категория 1 по GHS на ООН или като неклассифицирано по GHS на ООН. След това всеки от тези резултати може да се използва за прогнозиране на потенциала за сериозно увреждане на очите *in vivo* или на това, че няма за класифициране за опасност на очите по отношение на изпитвания химикал (вж. „Критерии за решението“). Независимо от това, не може да се определи класифициране за химикали, за които няма прогноза че предизвикват сериозно увреждане на очите, или че са неклассифицирани с метода за изпитване с ИПО (вж. точка 11).

Източник и възраст на птичите очи

Традиционно за този анализ се използват очи от птици, събрани в клиника, където птиците се убиват за консумация от човека, като така отпада необходимостта от лабораторни животни. Използват се само очи на здрави животни, смятани за подходящи за включване в хранителната верига на човека.

Въпреки че не е провеждано контролирано изследване за оценка на оптималната възраст, възрастта и теглото на птиците, които традиционно се използват в този метод за изпитване, са тези на пилетата, които традиционно се обработват в птицеклиници (т.е. на възраст приблизително 7 седмици, 1,5 — 2,5 kg).

Събиране и транспортиране на очите до лабораторията

Главите следва да се отстраняват незабавно след седяне на птиците, което обикновено става чрез електрически шок, и след срязване на шията за изтичане на кръвта. Източникът на птичи материал следва да е разположен в близост до лабораторията, за да може главите да се прехвърлят от клиниката в лабораторията достатъчно бързо, за да се сведе до минимум влошаването и/или бактериалното замърсяване. Интервалът от време между събирането на птичите глави и поставянето на очите в камерата за обливане след изваждането следва да бъде сведен до минимум (обикновено до два часа), за да се осигури спазването на критериите за приемливост на изследването. Всички очи, използвани в изследването, следва да бъдат от една и съща група очи, пробовзета през даден ден.

▼ **M7**

Тъй като дисекцията на очите се извършва в лабораторията, целите глави се транспортират от клиниката при стайна температура (обичайно между 18 °C и 25 °C) в пластмасови кутии, овлажнени с тъкани, намокрени с изотоничен солен разтвор.

Критерии за подбор и брой на очите, използвани в метода с ИПО

Очите с високо базово флуоресцеиново оцветяване (т.е. > 0,5) или с висока базова непрозрачност на роговицата (т.е. > 0,5) след изваждане се изхвърлят.

Всяка третирана група и паралелна положителна контрола се състои от минимум три очи. Отрицателната контролна група или контролата на разтворител (ако се използва разтворител, различен от солен разтвор) се състои от минимум едно око.

В случай на твърди материали, водещи до резултат NC по GHS се препоръчва втора серия с три очи за потвърждаване или отхвърляне на отрицателните резултати.

ПРОЦЕДУРА

Приготвяне на очите

Клепачите внимателно се изрязват, като се внимава да не се нарани роговицата. Целостта на роговицата бързо се проверява с капка 2 % (w/v) натриев флуоресцеин, приложен върху повърхността на роговицата в продължение на няколко секунди, и след това се изплаква с изотоничен солен разтвор. След това обработените с флуоресцеин очи се изследват с микроскоп с шпалт-лампа, за да се провери дали роговицата не е увредена (т.е. задържане на флуоресцеин и непрозрачност на роговицата $\leq 0,5$).

Ако не е увредено, окото се изрязва от черепа, като се внимава да не се нарани роговицата. Очната ябълка се изважда от орбитата, като мигателната ципа се държи здраво с хирургически форцепс, а очните мускули се срязват с извита ножица с тъп връх. Важно е да се избегне нараняването на роговицата от прекомерен натиск (т.е. артефакти от натиск).

Когато окото се извади от орбитата, към него трябва да остане закрепена видима част от очния нерв. След като вече бъде извадено от орбитата, окото се поставя върху абсорбираща подложка и се изрязват мигателната ципа и останалата свързваща тъкан.

Изваденото око се поставя в скоба от неръждаема стомана, като роговицата се разполага вертикално. След това скобата се пренася в камера на обливащия апарат (18). Скобите следва да бъдат разположени в обливащия апарат, така че цялата роговица да може да се облее с изотоничния солен разтвор (3-4 капки в минута или 0,1 до 0,15 ml/min). Камерите на обливащия апарат трябва да бъдат с контролирана температура от $32 \pm 1,5$ °C. В Допълнение 3 е дадена схема на един типичен обливащ апарат и на скобите за очи, които могат да бъдат купени или изработени. Апаратът може да се модифицира според нуждите на всяка лаборатория (напр. за побиране на различен брой очи).

След поставяне в обливащия апарат очите отново се оглеждат с микроскоп с шпалт-лампа, за да се провери дали не са наранени по време на дисекцията. На този етап се измерва и дебелината в най-високата точка на роговицата, като се използва дълбокомерът на микроскопа с шпалт-лампа. Очите с: i) задържане на флуоресцеин > 0,5; ii) непрозрачност на роговицата > 0,5; или iii), други признаци на увреждане, се подменят. От очите, които не са отстранени въз основа на някой от тези критерии, се отстраняват очите с дебелина на роговицата, отклоняваща се с повече от 10 % от средната стойност за всички очи. Потребителите следва да имат предвид, че микроскопите с шпалт-лампа може да отчетат различни стойности за дебелината на роговицата при различни настройки за шпалт-широчината. Шпалт-широчината следва да се настрои на 0,095 mm.

▼ M7

След като всички очи бъдат подложени на оглед и одобрени, те се инкубират в продължение на приблизително 45 до 60 минути за уравнивяване спрямо изпитваната система преди дозиране. След периода на уравнивяване се извършва нулево еталонно измерване на дебелината и непрозрачността на роговицата, което да служи за база при отчитането (напр. време = 0). За базово измерване за тази крайна точка се използва резултатът за флуоресценция, определен при дисекцията.

Прилагане на изпитвания химикал

Непосредствено след нулевите еталонни измервания окото (в държателя му) се изважда от обливащия апарат, поставя се в хоризонтално положение и върху роговицата се прилага изпитваният химикал.

Течните изпитвани химикали обикновено се изпитват неразредени, но може да се разреждат, ако това е необходимо (напр. като част от планирането на изследването). Предпочитан разтворител за разредени изпитвани химикали е физиологичният солен разтвор. Независимо от това, при контролирани условия могат да се използват и други разтворители, но трябва да се докаже, че е подходящо използването на разтворители, различни от физиологичния солен разтвор.

Течните изпитвани химикали се прилагат върху роговицата, така че цялата повърхност на роговицата да се покрие напълно с изпитвания химикал; стандартният обем е 0,03 ml.

Ако е възможно, твърдите изпитвани химикали следва да бъдат смлени възможно най-fino в хаван с чукало или подобно средство за смилане на прах. Прахът се прилага върху роговицата, така че повърхността да се покрие равномерно с изпитвания химикал; стандартното количество е 0,03 g.

Изпитваният химикал (в течна или твърда състояние) се прилага в продължение на 10 секунди и след това се отмива от окото с изотоничен солен разтвор (приблизително 20 ml) при температура на околната среда. След това окото (в държателя му) се връща в обливащия апарат в първоначалното му изправено положение. В случай на необходимост може да се приложи допълнително изплакване след 10-секундното прилагане и в следващи времеви точки (напр. при откриване на остатъчни количества от изпитвания химикал върху роговицата). По принцип количеството солен разтвор, използван за допълнително изплакване, не е от критично значение, но наблюдението на прилепването на химикала по роговицата е важно.

Химикали за контроли

Във всеки опит следва да се включват паралелни отрицателни контроли или контроли на разтворител/носител, и положителни контроли.

Когато се изпитват течности със 100 % концентрация или твърди вещества, за паралелна отрицателна контрола в метода за изпитване с ИПО се използва физиологичен солен разтвор, за откриване на неспецифични промени в изпитваната система и за да се осигури, че условията на изследването не водят до неподходящ отклик на дразнене.

Когато се изпитват разредени течности, в метода за изпитване се включва паралелна контролна група на разтворител/носител за откриване на неспецифични промени в изпитваната система и за да се осигури, че условията на изследването не водят до неподходящ отклик на дразнене. Както е посочено в точка 31, може да се използва само разтворител/носител, за който е доказано, че не влияе неблагоприятно върху изпитваната система.

Във всеки опит се включва известен химикал с дразнещо действие върху очите като паралелна положителна контрола, за удостоверяване предизвикването на съответен отклик. Тъй като при този метод за изпитване изследването на ИПО се използва за определяне на химикали с корозивно или силно дразнещо действие, положителната контрола следва да е референтен химикал, който при този метод за изпитване предизвиква остър отклик. Независимо от това, за да се гарантира, че може да се направи оценка на

▼ **M7**

варирането във времето на отклика на положителната контрола, големината на силния отклик не следва да е прекомерна. За положителната контрола следва да се генерират достатъчни данни *in vitro*, за да може да се изчисли статистически определен приемлив размах за положителната контрола. Ако за конкретна положителна контрола няма на разположение достатъчно данни от предходни изпитвания с метода за изпитване с ИПО, може да е необходимо да се проведат изследвания за набавяне на такава информация.

Примери за положителни контроли за течни изпитвани химикали са 10 % оцетна киселина или 5 % бензалкониев хлорид, а примери за положителни контроли за твърди изпитвани химикали са натриев хидроксид или имидазол.

Химикалите за сравнение са от полза за оценката на потенциала за дразнещо действие върху очите на неизвестни химикали от конкретен клас химикали или продуктово клас, или за оценка на относителния потенциал за дразнещо действие на химикали с дразнещо действие върху очите в рамките на конкретен размах от отклици на дразнене.

Измерени крайни точки

Роговиците за третиране се оценяват преди третирането и 30, 75, 120, 180 и 240 (± 5) минути след измиването, следващо третирането. Тези времеви точки осигуряват необходимия брой измервания през четиричасовия период на третиране, като същевременно между отделните измервания остава достатъчно време да се направят изискваните наблюдения върху всички очи.

Крайните точки, които се оценяват, са непрозрачност на роговицата, подуване на роговицата, задържане на флуоресцеин и морфологични ефекти (напр. образуване на вдлъбнатини или отпускане на епитела). Всички крайни точки, с изключение на задържането на флуоресцеин (което се определя само преди третирането и 30 минути след експозиция на изпитвания химикал), се определят във всяка от горните времеви точки.

Препоръчително е да се направят снимки за документиране на непрозрачността на роговицата, задържането на флуоресцеин, морфологичните ефекти и, ако се провежда, на хистопатологията.

След заключителното изследване след четири часа потребителите се насърчават да съхранят очите в подходящ фиксатор (напр. неутрален буферизиран формалин) за евентуално хистопатологично изследване (вж точка 14 и позоваване (8) за повече подробности).

Подуването на роговицата се определя от измерванията на дебелината на роговицата, направени с оптичен дебеломер на микроскопа с шпалт-лампа. То се изразява процентно и се изчислява от измерванията на дебелината на роговицата по следната формула:

$$\left(\frac{\text{дебелина на роговицата в момент } t - \text{дебелина на роговицата в момент } = 0}{\text{дебелина на роговицата в момент } = 0} \right) \times 100$$

Средната процентна стойност за подуването на роговицата за всички изпитвани очи се изчислява за всички времеви точки, в които се извършва наблюдение. На базата на най-високата средна стойност за подуване на роговицата, отчетена в която и да е времева точка, се определя обща балова оценка на категоризация за всеки изпитван химикал (вж. точка 51).

Непрозрачността на роговицата се оценява като за баловата оценка се използва площта от роговицата, която е най-плътна непрозрачна, както е показано в таблица 1. Средната стойност за непрозрачност на роговицата за всички изпитвани очи се изчислява за всички времеви точки, в които се извършва измерване. На базата на най-високата средна стойност за непрозрачност на роговицата, отчетена в която и да е времева точка, се определя обща балова оценка на категоризация за всеки изпитван химикал (вж. точка 51).

▼ **M7**

Таблица 1.

Балови оценки за непрозрачност на роговицата.

Балова оценка	Наблюдение
0	Липсва непрозрачност
0,5	Много слаба непрозрачност
1	Разпръснати или дифузни области; ясно се виждат детайли от ириса
2	Лесно забележима полупрозрачна област; детайлите на ириса са леко замъглени
3	Силна непрозрачност на роговицата; не се наблюдават специфичните детайли на ириса; размерите на лещата едва се забелязват
4	Пълна непрозрачност на роговицата; ирисът не се вижда

Задържането на флуоресцеин се оценява единствено във времевата точка за отчитане 30-та минута, както е показано в таблица 2. Средната стойност за задържане на флуоресцеин за всички изпитвани очи се изчислява само за времевата точка за отчитане 30-та минута, и се използва за определяне на общата балова оценка на категоризация за всеки изпитван химикал (вж. точка 51).

Таблица 2.

Балови оценки за задържане на флуоресцеин.

Балова оценка	Наблюдение
0	Липсва задържане на флуоресцеин
0,5	Много слабо оцветяване на отделни клетки
1	Оцветяване на отделни клетки, разпръснати по цялата третирана площ на роговицата
2	Фокално или сливащо се плътно оцветяване на отделни клетки
3	Сливащи се големи площи от роговицата, задържащи флуоресцеин

Морфологичните ефекти включват „образуване на вдлъбнатини“ по епителните клетки на роговицата, „отпускане“ на епитела, „грапавост“ на повърхността на роговицата и „залепване“ на изпитвания химикал по роговицата. Тези наблюдения могат да са с различна тежест и да възникват едновременно. Класифицирането на тези наблюдения е субективно според тълкуването на изследователя.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Оценка на данните**

Резултатите за непрозрачност на роговицата, подуване и задържане на флуоресцеин следва да бъдат оценени поотделно, за да се определи ИПО-клас за всяка крайна точка. След това ИПО-класовете за всяка крайна точка се комбинират, за да се направи класифициране за дразнещо действие за всеки изпитван химикал.

Критерии за решението

След като се направи оценка за всяка крайна точка, могат да се определят ИПО-класовете на базата на предварително зададен диапазон. Тълкуването на подуването на роговицата (таблица 3), непрозрачността (таблица 4), и

▼ **M7**

задържането на флуоресцеин (таблица 5) с помощта на четири ИПО-класа се извършва съгласно следните скали: Важно е да се отбележи, че баловите оценки за подуване на роговицата, посочени в таблица 3, са приложими само ако дебелината се измерва с микроскоп с шпалт-лампа (например Haag-Streit BP900 с дълбокомер № 1 и настройка за шпалт-широчината $9\frac{1}{2}$, което е равно на 0,095 mm. Потребителите следва да имат предвид, че микроскопите с шпалт-лампа може да отчитат различни стойности за дебелината на роговицата при различни настройки за шпалт-широчината.

Таблица 3.

Критерии за ИПО класифициране за подуване на роговицата.

Средно подуване на роговицата (%) (*)	ИПО клас
0 до 5	I
> 5 до 12	II
> 12 до 18 (> 75 min след третиране)	II
> 12 до 18 (≤ 75 min след третиране)	III
> 18 до 26	III
> 26 до 32 (> 75 min след третиране)	III
> 26 до 32 (≤ 75 min след третиране)	IV
> 32	IV

(*) най-висока средна балова оценка, отчетена в която и да е времева точка

Таблица 4.

Критерии за ИПО класифициране за непрозрачност.

Максимална средна балова оценка за непрозрачност (*)	ИПО клас
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Максимална средна балова оценка, отчетена в която и да е времева точка (въз основа на баловите оценки за непрозрачност, определени в таблица 1).

Таблица 5.

Критерии за ИПО класифициране за средно задържане на флуоресцеин.

Средна балова оценка за задържане на флуоресцеин на 30-та минута след третиране (*)	ИПО клас
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Въз основа на балови оценки, както са определени в таблица 2.

In vitro класифицирането за даден изпитван химикал се оценява, като се използва класифицирането по GHS, което съответства на комбинацията от категории, получени за подуване на роговицата, непрозрачност на роговицата и задържане на флуоресцеин, както е описано в таблица 6.

▼ **M7**

Таблица 6.
Общо *in vitro* класифициране.

Класифициране по GHS на ООН	Комбинации на 3-те крайни точки
Без категория	3 × I 2 × I, 1 × II
Не може да се направи прогноза	Други комбинации
Категория 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Непрозрачност на роговицата ≥ 3 при 30 min (в най-малко 2 очи) Непрозрачност на роговицата = 4 във всяка времева точка (в най-малко 2 очи) Силно отпускане на епитела (в най-малко 1 око)

(*) Комбинации, които могат да се получат с по-малка вероятност.

Критерии за приемливост на изпитването

Едно изпитване се смята за приемливо, когато паралелната отрицателна контрола или контролата на разтворител/носител и паралелната положителна контрола се определят съответно като неклассифицирана по GHS и от категория 1 по GHS.

Протокол от изпитването

Протоколът от изпитването следва да включва следната информация, когато тя се отнася за провеждането на изпитването:

Изпитвани химикали и химикали за контроли

- Наименование(-я) на химикала, като например структурното наименование, използвано от Службата за химични индекси CAS, следвано от други наименования, ако са известни;
- Регистрационен номер по CAS (RN), ако е известен;
- Чистота и състав на изпитвания химикал/химикала за контрола (в тегловни проценти), доколкото такава информация е налична;
- Физични и химични свойства, като например агрегатно състояние, летливост, рН, стабилност, химичен клас, водоразтворимост, отнасяща се до провеждането на изследването;
- Обработка на изпитвания химикал/химикала за контрола, преди изпитването, ако е приложимо (напр. нагряване, смилане);
- Стабилност, ако е известна;

Информация за финансиращия и за изпитващата лаборатория

- Име и адрес на финансиращия, на изпитващата лаборатория и на ръководителя на изследването;
- Идентификация на източника на очите (напр. клиницата, от която са събрани);

Условия на метода за изпитване

- Описание на използваната изпитвана система;

▼ M7

- Използван микроскоп с шпалт-лампа (напр. модел) и инструментални настройки на използвания микроскоп с шпалт-лампа;
- Препратка към резултатите за отрицателните и положителните контроли за предходни периоди и, ако е приложимо, данни за предходни периоди, доказващи приемлив размах за паралелни контроли с химикали за сравнение;
- Процедурата, използвана за осигуряване на цялостност (т.е. точност и надеждност) на метода за изпитване във времето (напр. периодично изпитване на химикали за изпитването за пригодност).

Пробовземане и приготвяне на очите

- Възрастта и теглото на животното донор и, ако са налични, други специфични характеристики на животните, от които са събрани очите (напр. пол, порода);
- Условието на съхранение и транспортиране на очите (напр. дата и час на пробовземане на очите, период от време между събирането на птичите глави и поставянето на извадените очи в камерата за обливане);
- Приготвяне и поставяне на очите, включително декларация за качеството им, температурата на очните камери и критериите за подбор на очите, използвани за изпитването.

Процедура за изпитване

- Брой на повторенията;
- Идентичност на използваните отрицателни и положителни контроли (ако е приложимо, също и на разтворителя и на контролите с химикали за сравнение);
- Доза от изпитвания химикал, прилагане и времето на експозиция, които ще бъдат използвани;
- Времени точки, в които се извършват наблюденията (преди и след третиране);
- Описание на използваните критерии за оценка и за решение;
- Описание на използваните критерии за приемливост на изследването.
- Описание на всякакви изменения на процедурата за изпитване.

Резултати

- Таблично представяне на баловите оценки за подуване на роговицата, непрозрачност и задържане на флуоресцеин, получени за всяко отделно око и за всяка времева точка на наблюдение, включително средните балови оценки за всяко време на наблюдение на всички изпитвани очи;
- Най-високата средна стойност на баловите оценки за подуване на роговицата, непрозрачност и задържане на флуоресцеин (от която и да е времева точка), и съответстващият ѝ ИПО клас.
- Описание на всички други наблюдавани ефекти;
- Изведеното *in vitro* класифициране по GHS;
- Ако са приложими, снимки на окото;

*Обсъждане на резултатите.**Заклучение*

▼ M7

ЛИТЕРАТУРА

- (1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report — *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517.: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm
- (2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. На разположение на адрес: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. На разположение на адрес: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>.
- (4) United Nations (UN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, UN New York and Geneva, 2011. На разположение на адрес: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html
- (5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.
- (6) Глава Б.5 от настоящото приложение, Остра токсичност: очно дразнещо/корозивно действие.
- (7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. *Toxicology In Vitro* 24, 1-9.
- (8) OECD (2011) Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants. Series on Testing and Assessment no. 160, OECD, Paris.
- (9) ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. На разположение на адрес: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm
- (10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.
- (11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. На разположение на адрес: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>.
- (12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.
- (13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.

▼M7

- (14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.
- (15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicology in Vitro* 20,78-81.
- (16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. На разположение на адрес: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>.
- (17) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
- (18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼ M7*Допълнение 1*

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: степента на близост на на резултатите от метода за изпитване и приетите референтни стойности. Това е мярка за характеристиките на метода за изпитване и аспект на „относимостта“. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съответствие“, за да се обозначи относителният дял на правилните резултати при даден метод за изпитване.

Химикал за сравнение: Химикал, използван като еталон за сравнение с изпитван химикал. Химикалът за сравнение следва да притежава следните свойства: i) постоянен и надежден източник (или източници); ii) структурно и функционално сходство с класа на изпитваните химикали; iii) известни физични/химични характеристики; iv) потвърждаващи данни за известни въздействия; и v) известен потенциал в размаха на желаните отклик

Подход „отдолу нагоре“: поетапен подход, използван за химикали, за които се предполага, че не се изисква класифициране за дразнене на очите или сериозно увреждане на очите, който започва с определяне на химикали, за които не се изисква класифициране (отрицателни резултати) по отношение на други химикали (положителен резултат).

Химикал: Вещество или смес.

Роговица: Прозрачната част на предната страна на очната ябълка, която покрива ириса и зеницата и пропуска светлината навътре.

Непрозрачност на роговицата: Мярка за степента на непрозрачност на роговицата след експозиция на изпитвания химикал. Повишената непрозрачност на роговицата е показател за увреждане на роговицата.

Подуване на роговицата: Обективно измерване, при изпитването с ИПО, на степента на разширение на роговицата след експозиция на изпитван химикал. Изразява се като процентна стойност и се изчислява от базовите (преди дозиране) измервания за дебелината на роговицата и дебелината, отчитана през редовни интервали от време след експозиция на изпитвания химикал в изпитването с ИПО. Степента на подуване е показател за увреждането на роговицата.

Дразнене на очите: Предизвикване на промени в очите вследствие на прилагане на изпитван химикал към предната повърхност на окото, които са напълно обратими в рамките на 21 дни след прилагането. Терминът е взаимозаменяем с „Обратими ефекти върху очите“ и с „Категория 2 по GHS на ООН“ (4).

Процент неверни отрицателни резултати: Делът на всички положителни химикали, невярно определени като отрицателни по даден метод за изпитване. Това е един от показателите за характеристиките на метода за изпитване.

Процент неверни положителни резултати: Делът на всички отрицателни химикали, невярно определени като положителни по даден метод за изпитване. Това е един от показателите за характеристиките на метода за изпитване.

Задържане на флуоресценци: Субективно измерване при изпитването с ИПО за степента на задържане на натриев флуоресценци от епителните клетки на роговицата след експозиция на изпитвано вещество. Степента на задържане на флуоресценци е показател за увреждането на епитела на роговицата.

Опасност: Вътрешноприсъщо свойство на даден агент или ситуация, притежаващ потенциал да предизвика неблагоприятни ефекти, когато организмът, система или (суб-)популация бъдат експонирани на този агент.

Необратими въздействия върху очите: Вж. „сериозно увреждане на очите“ и „категория 1 по GHS на ООН“.

▼ M7

Смес: Смес или разтвор, съставена (съставен) от две или повече вещества, в която (който) те не си взаимодействат (4).

Отрицателна контрола: Нетретирано повторение, съдържащо всички компоненти на дадена изпитвана система. Тази проба се обработва с пробите, третирани с изпитвания химикал, и с други контролни проби, за определяне дали разтворителят взаимодейства с изпитваната система.

Некласифицирани: вещества, които не са класифицирани за дразнене на очите (категория 2 по GHS на ООН) или сериозно увреждане на очите (категория 1 по GHS на ООН). Терминът е взаимозаменяем с „без категория“ по GHS на ООН“.

Положителна контрола: Повторение, съдържащо всички компоненти на дадена изпитвана система, и третирано с химикал, за който е известно, че предизвиква положителен отклик. За да се гарантира, че може да се направи оценка на измененията във времето на отклика на положителната контрола, големината на силния отклик не следва да е прекомерна.

Надеждност: мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да се приложи възпроизводимо в една и съща лаборатория и в различни лаборатории по различно време, при използване на един и същи протокол. Оценката за нея се прави, като се изчислява вътрешнолабораторната и междулабораторната възпроизводимост и вътрешнолабораторната повторяемост.

Обратими въздействия върху очите: Вж. „дразнене на очите“ и „категория 2 по GHS на ООН“.

Сериозно увреждане на очите: Предизвикване на тъканно увреждане на окото или сериозно физическо влошаване на зрението след прилагане на изпитван химикал към предната повърхност на окото, което не е напълно обратимо в рамките на 21 дни след прилагането. Терминът е взаимозаменяем с „Необратими ефекти върху очите“ и с „Категория 1 по GHS на ООН“ (4).

Микроскоп с шпалт-лампа: Инструмент, използван за непосредствено изследване на очите под увеличение с бикулярен микроскоп чрез създаване на стереоскопично изправено изображение. При метода за изпитване с ИПО този инструмент се използва за наблюдаване на предната структура на птичите очи, както и за обективно измерване на дебелината на роговицата с дълбокомера, с който е комплектован.

Контрол на разтворител/носител: Нетретирана проба, съдържаща всички компоненти на дадена изпитвана система, включително разтворителя или носителя, която се обработва с пробите, третирани с изпитвания химикал, и с други контролни проби, за определяне на базовия отклик при пробите, третирани с изпитвания химикал, разтворен в същия разтворител или носител. Когато се изпитва с паралелна отрицателна контрола, тази проба показва също дали разтворителят или носителът взаимодействат с изпитваната система.

Вещество: химичен елемент и неговите съединения в естествено състояние или получени чрез всеки производствен процес, включително всяка добавка, необходима за запазване на стабилността на продукта и всеки примес, извлечен от използвания процес, с изключение на всеки разтворител, който може да бъде отделен, без да се засяга стабилността на веществото или да се променя неговият състав (4).

Повърхностноактивно вещество: също така наречено повърхностно-активен агент, представлява вещество, като например детергент, което е в състояние да намали повърхностното напрежение на дадена течност и по този начин да позволи образуването на пяна в течността или проникването ѝ в твърди вещества; Известно е също като мокрител.

▼ M7

Подход „отгоре надолу“: поетапен подход, използван за химикал, за който се предполага, че предизвиква сериозно увреждане на очите, който започва с определяне на химикали, предизвикващи сериозно увреждане на очите (положителен резултат), по отношение на други химикали (отрицателен резултат).

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

Стратегия за поетапно изпитване: стратегия за поетапно изпитване, при която цялата съществуваща информация за даден изпитван химикал се разглежда по конкретен ред, като на всеки етап се прилага процес, основан на тежестта на доказателствата, за определяне дали съществува достатъчно информация за вземане решение за класифициране с оглед на опасността, преди да се премине към следващия етап. Ако потенциалът за дразнещо действие на даден изпитван химикал може да се определи въз основа на съществуващата информация, не се налага допълнително изпитване. Ако потенциалът за дразнещо действие на даден изпитван химикал не може да се определи въз основа на съществуващата информация, се провежда процедура за поетапно последователно изпитване върху животни, докато стане възможно да се направи ясно класифициране.

Глобална хармонизирана система на Организацията на обединените нации за класифициране и етикетирание на химикали (GHS на ООН): система, предлагаща класифициране на химикали (вещества и смеси) според стандартизирани видове и степени на физическа, здравна и екологична опасност и разглеждаща съответни съобщителни елементи, като например пиктограми, сигнални думи, предупреждения за опасност, препоръки за безопасност и информационни листове за безопасност, така че те да съобщават информация за тяхното неблагоприятно въздействие с оглед защита на хората (включително работодатели, работещи, служители в транспорта, потребители и аварийни служители) и на околната среда (4).

Категория 1 по GHS на ООН: вж. „сериозно увреждане на очите“ и/или „необратими ефекти върху очите“.

Категория 2 по GHS на ООН: Вж. „дразнене на очите“ и/или „обратими ефекти върху очите“.

„Без категория“ по GHS на ООН: Вещества, които не отговарят на изискванията за класифициране като категория 1 или 2 (2A или 2B) по GHS на ООН. Терминът е взаимозаменяем с „Некласифицирани“.

Валидиран метод за изпитване: метод за изпитване, за който са извършени изследвания за валидиране за определяне на относимостта (включително на точността) и надеждността му за конкретна цел. Важно е да се отбележи, че характеристиките на един валидиран метод за изпитване може да не са достатъчни по отношение на точността и надеждността, за да се счита той за приложим за предлаганата цел.

Процес, основан на тежестта на доказателствата: Процесът на отчитане на силните и слабите страни на различни видове информация за достигане до дадено заключение относно потенциалната опасност на даден химикал, и в подкрепа на това заключение.

▼ M7

Допълнение 2

ХИМИКАЛИ ЗА ИЗПИТВАНЕ ЗА ПРИГОДНОСТ ЗА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ С ИПО

Преди рутинното използване на метод за изпитване, който се придържа към настоящия метод за изпитване, лабораториите следва да докажат техническата си компетентност, като правилно определят класификацията за опасност за 13-те химикала, препоръчани в Таблица 1. Тези химикали са подбрани да представляват размаха на отклиците за опасности за очите, въз основа на резултати от изпитването *in vivo* със заешки очи (TG 405) и системата за класифициране GHS на ООН (т.е. категории 1, 2A, 2B, или неклассифицирани по GHS на ООН) (4)(6). Други критерии за подбор са били това, че химикалите са налични в търговската мрежа, че са налични висококачествени *in vivo* референтни данни и че са налични висококачествени данни от *in vitro* метода за изпитване с ИПО. Референтни данни са дадени в рационализиращия обобщаващ документ (5) и в документа на ICCVAM за контекстуален преглед за метода за изпитване с ИПО (9).

Таблица 1:

Препоръчвани химикали за доказване на техническа компетентност по отношение на метода за изпитване с ИПО

Химикал	CASRN	Химичен клас ⁽¹⁾	Агрегатно състояние	<i>In vivo</i> класифициране ⁽²⁾	<i>In vitro</i> класифициране ⁽³⁾
Бензалкониев хлорид (5 %)	8001-54-5	Ониево съединение	Течност	Категория 1	Категория 1
Хлорхексидин	55-56-1	Амин, Амидин	Твърдо	Категория 1	Категория 1
Дибензоил-L-винена киселина	2743-38-6	Карбоксилна киселина, естер	Твърдо	Категория 1	Категория 1
Имидазол	288-32-4	Хетероциклено	Твърдо	Категория 1	Категория 1
Трихлорооцетна киселина (30 %)	76-03-9	Карбоксилна киселина	Течност	Категория 1	Категория 1
2,6-Дихлоробензоил-хлорид	4659-45-4	Ацилов халид	Течност	Категория 2A	Не може да се направи прогноза ⁽⁴⁾
Амониев нитрат	6484-52-2	Неорганична сол	Твърдо	Категория 2A ⁽⁵⁾	Не може да се направи прогноза ⁽⁴⁾
Етил-2-метилацетоацетат	609-14-3	Кетон, естер	Течност	Категория 2B	Не може да се направи прогноза ⁽⁴⁾
Диметилсулфоксид	67-68-5	Органично сярно съединение	Течност	Без категория	Без категория
Глицерол	56-81-5	Алкохол	Течност	Без категория	Без категория (гранично)
Метилциклопентан	96-37-7	Въглеродород (цикличен)	Течност	Без категория	Без категория
n-Хексан	110-54-3	Въглеродород (ацикличен)	Течност	Без категория	Без категория

▼ **M7**

Химикал	CASRN	Химичен клас ⁽¹⁾	Агрегатно състояние	<i>In vivo</i> класифициране ⁽²⁾	<i>In vitro</i> класифициране ⁽³⁾
Триацетин	102-76-1	Липид	Течност	Некласифициран	Без категория

Съкращения: CASRN = Номер по Служба за химични индекси CAS

⁽¹⁾ за всеки изпитван химикал са определени химични класове, като за целта се използва стандартна схема за класификация, базираща се на системата за класификация MeSH (National Library of Medicine Medical Subject Headings) (на разположение на адрес: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>)

⁽²⁾ Базира се на резултати от изпитване *in vivo* със заешки очи (ОИСП TG 405) и се използва глобалната система GHS на ООН (4)(6).

⁽³⁾ Въз основа на резултати от ИПО, както са определени в таблица 6.

⁽⁴⁾ Комбинация от балови оценки по ИПО, различни от посочените в таблица 6 за идентифициране на „Без категория“ по GHS и категория 1 по GHS (вж. таблица 6)

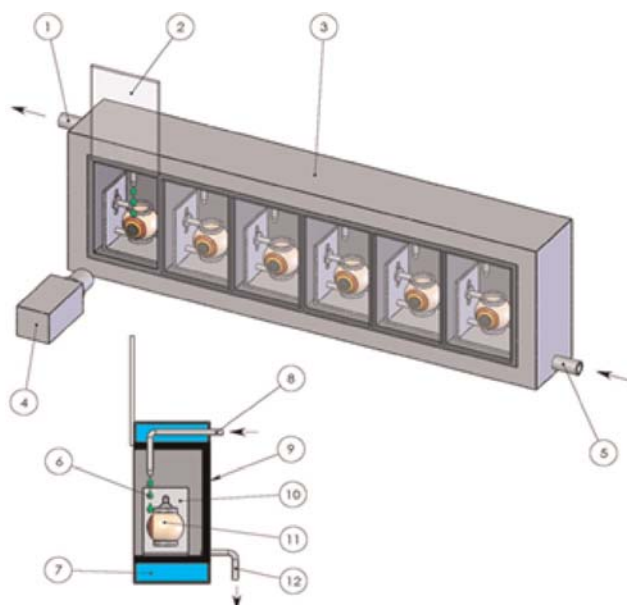
⁽⁵⁾ Класифицирането като 2A или 2B зависи от тълкуването на критерия от GHS на ООН за разграничаване между тези две категории, т.е. 1 от 3 спрямо 2 от 3 животни с ефекти в ден 7 са необходими за класифициране в категория 2A. *In vivo* изследването е включвало 3 животни. Всички крайни точки, с изключение на зачервяване на конюнктивата при едно животно, са възстановени до оценка нула към ден 7 или по-рано. Едното животно, което не се е възстановило напълно до ден 7, е имало зачервяване на конюнктивата с оценка 1 (в ден 7), което се е възстановило напълно в ден 10.

▼ M7

Допълнение 3

СХЕМИ НА ОБЛИВАЩ АПАРАТ ЗА ИПО И СКОБИ ЗА ОЧИ

(Вж. *Virton et al. (18)* за допълнителни общи описания на обливащия апарат и скобите за очи)



CROSS SECTION COMPARTMENT

EYE HOLDER

Позиция №	Описание	Позиция №	Описание
1	Изход топла вода	9	Отделение
2	Плъзгаща се врата	10	Държател за очите
3	Обливащ апарат	11	Птиче око
4	Оптически измервателен инструмент	12	Изход солена разтвор
5	Вход топла вода	13	Застопоряващ винт
6	Солена разтвор	14	Регулируемо горно рамо
7	Топла вода	15	Фиксирано долно рамо
8	Вход солена разтвор		

▼ **M7****Б.49. ИЗПИТВАНЕ *IN VITRO* ЗА МИКРОЯДРА В КЛЕТКИ ОТ БОЗАЙНИЦИ****ВЪВЕДЕНИЕ**

Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на Насоки за изпитване 487 на ОИСП (2014). Той е част от серия методи за изпитване от областта на генетичната токсикология. Разработен е документ на ОИСП, съдържащ ясна информация относно изпитванията в областта на генетичната токсикология, и преглед на актуалните изменения на посочените Насоки (1).

Изпитването *in vitro* за микроядра (MNvit) е изпитване за генотоксичност за откриване на микроядра (МЯ) в цитоплазмата на интерфазни клетки. Микроядрата могат да произлизат от ацентрични хромозомни фрагменти (т.е. с липсваща центромера) или от цели хромозоми, които не са в състояние да се придвижат към полюсите по време на анафазния стадий на клетъчното делене. Поради това изпитването MNvit е *in vitro* метод, който осигурява изчерпателна основа за изследване на потенциала за увреждане на хромозомите *in vitro*, тъй като могат да бъдат откривани както анеугени, така и кластогени (2) (3) в клетки, които са преминали през клетъчно делене по време на експозиция на изпитвания химикал или след това (вж. точка 13 за повече подробности). Микроядрата са увреждане, което е било предадено на дъщерните клетки, докато хромозомните аберации, преброени в метафазните клетки, могат да не бъдат предадени. И в двата случая измененията може да не са съвместими с оцеляването на клетките.

Настоящият метод за изпитване (МИ) позволява използването на протоколи със и без инхибитор на полимеризацията на актина — цитохалазин Б (цитоб). Добавянето на цитоб преди митозата води до клетки, които са двудрени, и следователно позволява идентифицирането и анализа на микроядра само в онези клетки, които са преминали през една митоза (4) (5). Настоящият метод за изпитване позволява използването на протоколи без блокиране на цитокинезата, при условие че са налице доказателства за това, че анализиранията популация на клетки е преминала през митоза.

В допълнение към използването на изпитването MNvit за идентифициране на химикали (вещества и смеси), които индуцират микроядра, използването на имунохимично маркиране на кинетохорите или хибридизация с центромерни/теломерни проби (флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH)) също може да предостави допълнителна информация относно механизмите на увреждане на хромозомите и образуване на микроядра (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Тези процедури на маркиране и хибридизация могат да бъдат използвани, когато е налице увеличено образуване на микроядра и изследователят пожелае да определи дали увеличението е в резултат от кластогенни и/или анеугенни ефекти.

Тъй като микроядрата в интерфазните клетки могат да бъдат оценени относително обективно, лабораторният персонал трябва да определи единствено броя на двудрените клетки, когато се употребява цитоб, и честотата на клетките с микроядра във всички случаи. В резултат на това предметните стъкла могат да бъдат преброени относително бързо, а анализът може да бъде автоматизиран. Поради това е практично да се преброят хиляди вместо стотици клетки в рамките на едно третиране, с което се увеличава мощността на статистическия тест. Накрая, тъй като микроядрата могат да се породят от изоставящи хромозоми, налице е потенциал за откриване на агенти, предизвикващи анеуплоидия, които се изследват трудно в рамките на конвенционални изпитвания за хромозомни аберации, напр. глава Б.10 от настоящото приложение) (18). Независимо от това, изпитването MNvit, описано в настоящия метод за изпитване, не дава възможност за разграничаване на химикалите, предизвикващи промени в броя на хромозомите и/или пloidност, от химикалите, предизвикващи кластогенност, без специални техники, каквато е техниката FISH, посочена в точка 4.

Изпитването MNvit е устойчиво и може да се провежда при разнообразни типове клетки и при наличието или в отсъствието на цитоб. Налице са изчерпателни данни в подкрепа на валидността на изпитването MNvit с използване на различни типове клетки (култури от клетъчни линии или първични клетъчни култури) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Те включват по-конкретно данни от международните изпитвания за валидиране, координирани от Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23) и

▼ **M7**

от докладите от Международния семинар относно изпитването за генотоксичност (5) (17). Наличните данни също така бяха повторно оценени в рамките на ретроспективно изследване за валидиране, основано на тежестта на доказателствата, и извършено от Европейския център за валидиране на алтернативните методи (ECVAM) към Европейската комисия, и методът за изпитване беше одобрен като научно валиден от Научния консултативен комитет (НKK) на ECVAM (37) (38) (39).

При изпитването *in vitro* в клетки от бозайници могат да се използват култури от клетъчни линии или първични клетъчни култури с човешки произход или с произход от гризачи. Тъй като фоновата честота на микроядрата ще окаже влияние върху чувствителността на изпитването, препоръчва се използването на типове клетки със стабилна и определена фоновата честота на образуване на микроядра. Използваните клетки се избират въз основа на способността на растеж в културата, стабилността на кариотипа (включително броя на хромозомите) и спонтанната честота на микроядрата (40). Към настоящия момент наличните данни не позволяват да се направят категорични препоръки, но дават възможност да се предполага, че при оценяване на опасностите от химикали е важно да се разглеждат статусът на *p53*, генетичната (кариотипна) стабилност, капацитетът за поправка на ДНК и произходът (произход от гризачи спрямо човешки произход) на клетките, избрани за изпитване. По този начин ползвателите на настоящия метод за изпитване се насърчават, с увеличаването на познанията в тази област, да обърнат внимание на влиянието на тези и други клетъчни характеристики върху параметрите на дадена клетъчна линия при откриването на предизвикване на микроядра.

Използваните определения са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Изпитванията, провеждани *in vitro*, по принцип изискват използването на екзогенен източник на метаболитно активиране, освен когато клетките са с капацитет за метаболизиране по отношение на изпитваните химикали. Екзогенната система на метаболитно активиране не възпроизвежда изцяло *in vivo* условия. Следва внимателно да се избягват условия, които биха довели до изкуствено предизвикани положителни резултати, които не отразяват генотоксичността на изпитваните химикали. Такива условия включват промени в рН (41) (42) (43) или осмолалитета, взаимодействие със средата за отглеждане на клетки (44) (45) или прекомерно високи нива на цитотоксичност (вж. точка 29).

За целите на анализиране на индуцирането на микроядра от съществено значение е митозата да е настъпила както при третиране, така и при нетретиране култури. Най-информативният стадий за преброяване на микроядра е в клетки, които са завършили една митоза по време на третиране с изпитвания химикал, или след това. За произведени наноматериали е необходимо специфично адаптиране на настоящия метод за изпитване, но то не е описано в настоящия метод за изпитване.

Преди използването на метода за изпитване по отношение на смес с цел генериране на данни за планирана регулаторна цел, следва да се разгледа въпросът дали той може да даде адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо. Такива съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

Клетъчните култури с човешки произход или с произход от други бозайници се подлагат на експозиция на изпитвания химикал със и без екзогенен източник на метаболитно активиране, освен когато се използват клетки с достатъчен капацитет за метаболизиране (вж. точка 19).

По време на експозицията на изпитвания химикал или след това клетките се отглеждат за период, който е достатъчен, за да позволи увреждането на хромозомите или други ефекти върху клетъчния цикъл/клетъчно делене да доведат до образуването на микроядра в интерфазните клетки. За предизвикването на анеуплоидия изпитваният химикал обикновено следва да бъде наличен по време на митозата. Събраните и оцветените интерфазни клетки се анализират за наличието на микроядра. В идеалния случай микроядрата следва да бъдат преброени само в онези клетки, които са преминали през митоза по време на експозицията на изпитвания химикал или по време на периода след третирането, ако се използва такъв. При култури, които са

▼ **M7**

били третирани с блокатор на цитокинезата, това се постига лесно с броене само на двудрените клетки. При отсъствието на блокатор на цитокинезата е важно да се докаже, че анализираниите клетки вероятно са преминали през клетъчно делене въз основа на увеличаването на клетъчната популация по време на експозицията на изпитвания химикал или след това. За всички протоколи е важно да се докаже, че пролиферацията на клетки е настъпила както в контролните, така и в третираниите култури, и степента на цитотоксичност или цитостаза, предизвикана от изпитвания химикал, следва да бъде оценена във всички култури, в които се извършва преброяване за наличието на микроядра.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**Клетки**

Могат да се използват култивирани първични лимфоцити от периферна кръв с човешки произход или от други бозайници (7) (20) (46) (47) и редица клетъчни линии на гризачи, например клетки CHO, V79, CHL/LU и L5178Y или човешки клетъчни линии като ТК 6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (вж. точка 6). Други клетъчни линии като HT29 (48), Сасо-2 (49), НераRG (50) (51), НерG2 клетки (52) (53), А549 и първични клетки от ембрион на сирийски хамстер (54) са били използвани за изпитване за микроядра, но на този етап не са широко валидирани. Поради това използването на други клетъчни линии и типове следва да бъде обосновано въз основа на техните доказани характеристики в рамките на изпитването, както е описано в раздела „Критерии за приемливост“. Съобщено е, че цитоБ има потенциално въздействие върху растежа на клетки L5178Y и затова не се препоръчва с тази клетъчна линия (23). Когато се използват първични клетки, от съображения за хуманно отношение към животните следва да се разгледа използването на клетки от човешки произход, когато това е осъществимо, и от тях да се вземат проби в съответствие с човешките етични принципи и правната рамка.

Човешките лимфоцити от периферна кръв следва да бъдат получени от млади (на приблизителна възраст 18—35 години) индивиди, които не са пушачи, без известни заболявания и за които не е известно наскоро да са били подложени на експозиция на генотоксични агенти (напр. химикали, йонизиращи лъчения) на нива, които биха увеличили фоновата честота на клетките с микроядра. Това би гарантирало ниските и съгласувани стойности на фоновата честота на клетките с микроядра. Базовата честота на клетките с микроядра нараства с възрастта и тази тенденция е изразена при индивидите от женски пол, отколкото при индивидите от мъжки пол (55). Броят на донорите следва да бъде посочен, ако се обединят клетките от повече от един донор в обща група за използване. Необходимо е да се докаже, че клетките са преминали през делене от началото на третиранието с изпитвания химикал до вземането на проби от клетките. Клетъчните култури се поддържат във фаза на експоненциален растеж (клетъчни линии) или деленето им се стимулира (първични култури от лимфоцити) с оглед експозиция на клетките през различни етапи от клетъчния цикъл, тъй като чувствителността на клетъчните етапи по отношение на изпитваните химикали може да не е известна. Първичните клетки, чието делене трябва да бъде стимулирано с митогенни агенти, обикновено не се синхронизират повече по време на експозиция на изпитвания химикал (напр. човешки лимфоцити след 48-часова митогенна стимулация). Използването на синхронизирани клетки по време на третиранието с изпитвания химикал не е препоръчително, но може да бъде приемливо, ако е обосновано.

Среди и условия за отглеждане на културата

За отглеждането на културите трябва да бъдат използвани подходящи среда за отглеждане и инкубационни условия (съдове за отглеждане, влажна атмосфера с 5 % CO₂ ако е целесъобразно, температура на инкубиране от 37 °C). Клетъчните линии следва да се проверяват рутинно за стабилност на модалния брой на хромозомите и отсъствие на замърсяване от *Mycoplasma*, и клетките не трябва да се използват, ако са замърсени или ако има промени в модалния брой на хромозомите. Нормалната продължителност на клетъчния цикъл на клетъчните линии или първичните култури, използвани в лабораторията, провеждаща изпитването, следва да бъдат установени и следва да съответстват на публикуваните характеристики на клетките.

▼ **M7***Приготвяне на културите*

Клетъчни линии: размножават се клетки от изходни култури, посяват се в среда за отглеждане с такава посевна гъстота, че клетките в суспензии или в монослоевете да продължат експоненциалния си растеж до събирането (напр. сливането следва да се избягва при клетки, отглеждани в монослоевете).

Лимфоцити: цяла кръв, третирана с антикоагулант (напр. хепарин), или изолирани лимфоцити се отглеждат [напр. фитохемаглутинин (РНА) за човешки лимфоцити] за предизвикване на клетъчно делене преди експозиция на изпитвания химикал и цитоБ.

Метаболитно активиране

Следва да се използват екзогенни метаболизиращи системи при използването на клетки с недостатъчен ендогенен метаболитен капацитет. Най-често използваната система, която се препоръчва по подразбиране, освен ако е обоснована друга система, е пост-митохондриална фракция с добавка на ко-фактор (S9), приготвена от черен дроб на гризачи (обикновено плъхове), третирани с ензимно индуциращи агенти като Ароклор 1254 (56) (57) или съчетание от фенобарбитал и б-нафтофлавоин (58) (59) (60). Последното съчетание не противоречи на Стокхолмската конвенция за устойчивите органични замърсители (61) и е доказано, че е също толкова ефективно, колкото Ароклор 1254, за индуцирането на оксидази със смесени функции (58) (59) (60). Фракцията S9 обикновено се използва в концентрации, вариращи от 1 до 2 % (v/v), но може да се увеличи до 10 % (v/v) в окончателната среда за изпитване. Използването на продукти, намаляващи митотичния индекс, особено продукти, образуващи комплекси с калция (62), следва да се избягва по време на третирането. Изборът на типа и концентрацията на използваната екзогенна система за метаболитно активиране или метаболитен индуктор може да бъде повлиян от класа химикали, който се изпитва.

Приготвяне на химикала за изпитване

Твърдите изпитвани химикали следва да се подготвят в подходящи разтворители и, ако е необходимо, да се разреждат преди третиране на клетките. Течните химикали за изпитване могат да се добавят директно в системата за изпитване и/или да се разреждат преди третирането на системата за изпитване. Газообразните или летливите химикали за изпитване следва да бъдат изпитвани чрез подходящи изменения на стандартните протоколи, като например третиране в запечатани съдове (63) (64) (65). Приготвянето на изпитвания химикал следва да се извърши непосредствено преди третирането, освен ако данните за стабилността показват, че е допустимо съхранение.

Условия на изпитване*Разтворители*

Разтворителят трябва да бъде избран с цел оптимизиране на разтворимостта на изпитваните химикали, без да се оказва негативно влияние върху извършването на изследването, т.е. промяна на клетъчния растеж, засягане на целостта на изпитвания химикал, реакция със съдовете за отглеждане, нарушаване на системата за метаболитно активиране. Препоръчва се винаги, когато е възможно, най-напред да се разглежда възможността за използване на вода като разтворител (или среда за отглеждане). Добре утвърдени разтворители са например водата или диметилсулфоксидът (DMSO). Като цяло органичните разтворители следва да не надвишават 1 % (v/v). Ако цитоБ е разтворен в DMSO, общото количество органичен разтворител, използван както за изпитвания химикал, така и за цитоБ, следва да не превишава 1 % (v/v); в противен случай следва да се използват нетретирани контроли, за да се гарантира, че процентът на органичния разтворител няма неблагоприятно въздействие. Водните разтворители (физиологичен разтвор или вода) не трябва да превишават 10 % (об./об.) в окончателната среда за третиране. Ако се използват разтворители, които не са добре утвърдени (напр. етанол или ацетон), използването им следва да бъде подкрепено от данни за съвместимостта им с изпитвания химикал и системата за изпитване, както и за това, че не са генетично токсични при използваната

▼ M7

концентрация. При липса на подкрепящи данни е важно да се включат нетретиран контрол (виж допълнение 1), както и контроли на разтворител, за да се докаже, че избраният разтворител не предизвиква никакви неблагоприятни или хромозомни ефекти (напр. анеуплоидия или кластогенност).

Използване на цитоБ като блокер на цитокинезата

Едно от най-важните съображения при извършването на изпитването MNvit е да се осигури, че преброяваните клетки са преминали през митоза по време на третирането или инкубационния период след третирането, ако се използва такъв. Поради това преброяването на микроядра следва да се ограничи до клетки, които са преминали през митоза по време на третирането или след това. ЦитоБ е агентът, който е бил най-широко използван за блокиране на цитокинезата, тъй като той инхибира съединяването на актина и по този начин предотвратява отделянето на дъщерни клетки след митозата, което води до образуването на двуядрени клетки (6) (66) (67). Когато се използва цитоБ, може същевременно да се измери и ефектът на изпитвания химикал върху кинетиката на клетъчната пролиферация. ЦитоБ следва да бъде използван като блокер на цитокинезата, когато се използват човешки лимфоцити, тъй като времената на клетъчния цикъл ще варират при различните донори и тъй като не всички лимфоцити ще реагират на стимулирането на фитохемаглутина. ЦитоБ не е задължителен за други клетъчни типове, ако може да се установи, че те са преминали през делене, както е описано в точка 27. Освен това цитоБ обикновено не се използва, когато пробите се оценяват за микроядра с използване на поточни цитометрични методи.

За да се постигне оптималната честота на двуядрени клетки в контролните култури на разтворител, лабораторията трябва да определи за всеки тип клетки подходящата концентрация на цитоБ, и следва да докаже, че при нея се получава добър добив на двуядрени клетки за преброяване. Подходящата концентрация на цитоБ обикновено е между 3 и 6 µg/ml (19).

Измерване на клетъчната пролиферация и цитотоксичността и избор на концентрации на третиране

При определяне на най-високата концентрация на изпитвания химикал следва да се избягват концентрациите, които могат да доведат до изкуствено предизвикан положителен отклик, като например предизвикващите прекомерна цитотоксичност (вж. точка 29), утаяване в средата за отглеждане (вж. точка 30) или явни промени в рН или осмолалитета (вж. точка 9). Ако изпитваният химикал предизвиква явна промяна в рН на средата към момента на добавянето, рН може да бъде коригиран чрез буферизиране на окончателната среда за третиране, за да се избегнат изкуствено предизвикани положителни резултати и да се поддържат подходящи условия за отглеждане.

Извършват се измервания на пролиферацията на клетките, за да се гарантира, че достатъчен брой третирани клетки са преминали през митоза по време на изследването, както и че третирането са извършени при подходящи нива на цитотоксичност (вж. точка 29). Цитотоксичността следва да се определи в главния опит, със и без метаболитно активиране, като се използва подходяща индикация на клетъчната смърт и растеж (вж. точки 26 и 27). Въпреки че оценката на цитотоксичността в първоначално предварително изпитване може да бъде полезна за по-добро определяне на концентрациите, които ще се използват в основния опит, първоначалното изпитване не е задължително. Ако такава се извършва, то не следва да заменя измерването на цитотоксичността в главния опит.

Третирането на култури с цитоБ и измерването на относителните честоти на едноядрени, двуядрени и многоядрени клетки в културата осигурява точен метод за количествено определяне на ефекта върху пролиферацията на клетките и цитотоксичната или цитостатичната активност на дадено третиране (6) и гарантира, че се преброяват само клетки, които са преминали през делене по време на третирането или след него. За оценка на цитотоксичната и цитостатичната активност на дадено третиране чрез сравняване на стойностите в третираните и контролните култури се препоръчват индексът на пролиферация при блокиране на цитокинезата (CBPI) (6) (27) (68) или индексът на репликация (RI) от поне 500 клетки на култура

▼ M7

(вж. допълнение 2 за формули). Оценката на други показатели за цитотоксичност (напр. клетъчната цялост, апоптоза, некроза, метафазно преброяване, клетъчен цикъл) може да предостави полезна информация, но не следва да се използват като заместител на CBPI или RI.

При изследвания без цитоБ е необходимо да се докаже, че клетките в културата са преминали през делене, така че съществена част от преброените клетки са преминали през делене по време на третирането с изпитвания химикал или след него, като в противен случай могат да се получат неверни отрицателни отклици. За оценка на цитотоксичната и цитостатичната активност в дадено третиране се препоръчва измерването на относителното удвояване на популации (RPD) или на относителния ръст в количеството клетки (RICC) (17) (68) (69) (70) (71) (вж. допълнение 2 за формули). При удължени времена на пробовземане (напр. третиране с продължителност 1,5-2 пъти нормалната продължителност на клетъчния цикъл и събиране след още 1,5-2 пъти от нормалната продължителност на клетъчния цикъл, което води до времена на пробовземане, по-дълги от 3-4 пъти нормалната продължителност на клетъчния цикъл като цяло, както е описано в точки 38 и 39), RPD може да подцени цитотоксичността (71). При тези обстоятелства по-добро измерване може да се постигне с RICC, или оценката на цитотоксичността след 1,5-2 пъти нормалната продължителност на клетъчния цикъл би представлявала полезна прогнозна оценка. Оценката на други маркери за цитотоксичност или цитостаза (напр. клетъчната цялост, апоптоза, некроза, метафазно преброяване, индекс на пролиферация (PI), клетъчен цикъл, нуклеоплазмени мостове или нуклеотидни мостове) може да предостави допълнителна полезна информация, но не следва да се използва като заместител на RPD или на RICC.

Следва да бъдат оценени най-малко три концентрации на изпитване (без да се включват контролите на разтворител и положителните контроли), които отговарят на критериите за приемливост (подходяща цитотоксичност, брой на клетки и т.н.). Независимо от типа на клетките (клетъчни линии или първични култури от лимфоцити), при всяка изпитвана концентрация могат да се използват третирани култури с повторения или без повторение. Макар да се препоръчва използването на култури с повторение, използването на култури без повторение също е приемливо, при условие че е преброен същият общ брой клетки при културата без повторение и при културата с повторение. Използването на култури без повторение е от особено значение в случаите, когато се оценяват повече от 3 концентрации (виж точки 44-45). Резултатите, получени за културите с независими повторения при дадена концентрация, могат да бъдат обединени за анализа на данните. За изпитваните химикали, показващи слаба цитотоксичност, или не показващи цитотоксичност, обичайно са подходящи приблизително 2 до 3-кратни концентрационни интервали. Там, където се среща цитотоксичност, избраните изпитвани концентрации следва да са в обхват, в който се получава цитотоксичност, както е описано в точка 29, и да включват концентрации, при които има умерена, слаба и нулева цитотоксичност. Множество изпитвани химикали показват стръмни криви концентрация-отклик и за да се получат данни за слаба и умерена цитотоксичност, или за да се проучи подробно връзката доза-отклик, е необходимо да се използват по-близко разположени концентрации и/или над три концентрации (култури без повторение или с повторения), по-специално в ситуации, при които се изисква повтаряне на опита (вж. точка 60).

Ако максималната концентрация е базирана на цитотоксичност, най-високата концентрация следва да има за цел постигане на $55 \pm 5\%$ цитотоксичност при използване на препоръчаните параметри за цитотоксичност (т.е. намаляване при RICC и RPD за клетъчни линии, когато не се използва цитоБ, и намаляване при CBPI или RI, когато се използва цитоБ до $45 \pm 5\%$ от паралелната отрицателна контрола) (72). Трябва да се внимава при тълкуването на положителните резултати, които се срещат само в горния край на този диапазон $55 \pm 5\%$ цитотоксичност (71).

▼ M7

За малко разтворимите изпитвани химикали, които не са цитотоксични при концентрации, по-ниски от най-ниската неразтворима концентрация, най-високата анализирана концентрация трябва да предизвиква помътняване или утайка, видима с невъоръжено око или с помощта на инвертен микроскоп в края на третирането с изпитвания химикал. Дори ако цитотоксичността се наблюдава над най-ниската неразтворима концентрация, препоръчително е да се извърши изпитване само при една концентрация, която предизвиква помътняване или е с видима утайка, тъй като от утайката могат да се получат изкуствено предизвикани въздействия. При концентрацията, водеща до образуването на утайка, трябва да се вземат мерки, за да се гарантира, че утайката не пречи на провеждането на изпитването (напр. оцветяване или преброяване). Определянето на разтворимостта в средата за отглеждане преди началото на опита може да се окаже полезно.

Ако не се наблюдава утайка или ограничаваща цитотоксичност, най-високата изпитвана концентрация следва да съответства на 10 mM, 2 mg/ml или 2 µl/ml, в зависимост от това коя от стойностите е най-ниска (73) (74) (75). Когато изпитваният химикал не е с определен състав, например вещество с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали (UVCB) (76), екстракт от околната среда и др., може да е необходимо стойността на най-високата концентрация да е по-голяма (напр. 5 mg/ml), при липсата на достатъчна цитотоксичност, за да се увеличи концентрацията на всеки от компонентите. Следва да се отбележи обаче, че тези изисквания могат да се различават по отношение на фармацевтични продукти за хуманна употреба (93).

Контроли

Паралелните отрицателните контроли (вж. точка 21), състоящи се само от разтворител в средата за третиране, и третирани по същия начин като културите, които се третират, следва да се включат за всяко време на събиране.

Паралелните положителни контроли са необходими за доказване на способността на лабораторията за идентифициране на кластогени и анеугени при условията на използвания протокол за изпитването и на ефективността на екзогенната система за метаболитно активиране (когато е приложимо). Примери за положителни контроли са дадени в таблица 1 по-долу. Като положителни контроли могат да бъдат използвани алтернативни химикали, ако това е обосновано.

Понастоящем не са известни анеугени, които изискват метаболитно активиране на тяхната генотоксична активност (17). Използването на положителни контроли може да се ограничи до кластоген, изискващ метаболитно активиране, тъй като *in vitro* изпитванията върху клетки от бозайници са достатъчно стандартизирани за краткосрочно третиране, извършено паралелно с метаболитно активиране, или без метаболитно активиране, като се използва същата продължителност на третирането. В този случай отклик на кластогенна положителна контрола без повторение ще докаже както активността на дадена система за метаболитно активиране, така и способността на изпитваната система за генериране на отклик. Независимо от това, дългосрочното третиране (без S9) следва да има своя собствена положителна контрола, тъй като продължителността на третирането ще се различава от тази при изпитването, при което се използва метаболитно активиране. Ако за положителна контрола без повторение за краткотрайно третиране с метаболитно активиране и без метаболитно активиране е избран кластоген, следва да бъде избран анеуген за дългосрочното третиране без метаболитно активиране. В клетките с капацитет за метаболитизиране, които не изискват S9, следва да се използват положителни контроли както за кластогенност, така и за анеугенност.

Всяка положителна контрола следва да бъде използвана при една или повече концентрации, които се очаква да породят възпроизводими и откриваеми увеличения спрямо фона, за да се докаже чувствителността на системата за изпитване (т.е. ефектите са ясни, но не разкриват непосредствено на четящото устройство идентичността на кодираните предметни стъкла), и откликът следва да не бъде накърнен от цитотоксичност, надхвърляща границите, посочени в настоящия метод за изпитване.

▼ M7

Таблица 1.

Препоръчителни референтни химикали за оценка на пригодността на лабораторията и за подбор на положителни контроли

Категория	Химикал	CASRN
1. Кластогени, активни без метаболитно активиране		
	Метиллов метансулфонат	66-27-3
	Митомицин С	50-07-7
	4-Нитрохинолин- <i>N</i> -оксид	56-57-5
	Цитозин арабинозид	147-94-4
2. Кластогени, изискващи метаболитно активиране		
	Бензо(а)пирен	50-32-8
	Циклофосфамид	50-18-0
3. Анеугени		
	Колхицин	64-86-8
	Винбластин	143-67-9

ПРОЦЕДУРА

График на третиране

За да се увеличи в максимална степен вероятността за откриване на анеуген или кластоген, действащ на конкретен стадий от клетъчния цикъл, е важно достатъчен брой клетки, представляващи всички различни стадии на техните клетъчни цикли, да са третирани с изпитвания химикал. Всички третираня следва да започват и приключват, докато клетките растат експоненциално, а клетките следва да продължат да нарастват до момента на вземането на пробата. Поради това графикът на третиране за клетъчните линии и първичните клетъчни култури може да се различава в известна степен от графика за лимфоцитите, които изискват митогенна стимулация, за да започнат своя клетъчен цикъл (17). За лимфоцитите най-ефикасният подход е започване на третирането с изпитвания химикал 44-48 часа след стимулиране с РНА, когато клетките ще се делят асинхронно (6).

Публикуваните данни (19), показват, че повечето анеугени и кластогени ще бъдат открити в рамките на краткосрочно третиране от 3 до 6 часа при наличие и в отсъствие на S9, последвано от отстраняване на изпитвания химикал и вземане на проби след време, равно на около 1,5-2 пъти от нормалната продължителност на клетъчния цикъл след началото на третирането (7).

Независимо от това, за задълбочена оценка, която ще бъде необходима за заключение за отрицателни резултати, следва да са спазени всичките три от следните опитни условия с използване на краткосрочно третиране със и без метаболитно активиране и дългосрочно третиране без метаболитно активиране (вж. точки 56, 57 и 58):

— клетките следва да бъдат подложени на експозиция на изпитвания химикал без метаболитно активиране в продължение на 3 до 6 часа, и след време, равно на около 1,5-2 пъти от нормалната продължителност на клетъчния цикъл след началото на третирането от тях следва да се вземе проба (19),

— клетките следва да бъдат подложени на експозиция на изпитвания химикал с метаболитно активиране в продължение на 3 до 6 часа, и след време, равно на около 1,5-2 пъти от нормалната продължителност на клетъчния цикъл след началото на третирането от тях следва да се вземе проба (19),

▼ **M7**

— клетките следва да бъдат подложени на експозиция непрекъснато без метаболитно активиране до вземането на проба след време, равно на около 1,5-2 пъти от нормалната продължителност на клетъчния цикъл.

В случай че някои от посочените по-горе опитни условия води до положителен отклик, може да не се наложи изследване на никоя от останалите схеми на третиране.

Ако е известно или се допуска, че изпитваният химикал засяга продължителността на клетъчния цикъл (напр. при изпитване на нуклеозидни аналози), особено за р53-компетентни клетки (35) (36) (77), периодите на вземане на проби или възстановяване могат да бъдат удължени най-много с още 1,5-2,0 пъти от нормалната продължителност на клетъчния цикъл (т.е. общо 3,0 до 4,0 пъти продължителността на клетъчния цикъл след началото на краткосрочно и дългосрочно третиране). Тези варианти са насочени към ситуации, при които е възможно да има опасения, свързани с възможните взаимодействия между изпитвания химикал и цитоБ. При използване на удължени времена на вземане на проби (т.е. време на култивиране 3,0 до 4,0 пъти продължителността на клетъчния цикъл) трябва да се вземат мерки да се гарантира, че клетките все още активно се делят. Например, за лимфоцитите експоненциалният растеж може да намалее 96 часа след стимулацията и може да се достигне до сливане на еднослойните клетъчни култури.

Предложените графици на третиране на клетките са обобщени в таблица 2. Тези общи графици на третиране могат да бъдат изменяни (и следва да бъдат обосновани) в зависимост от стабилността или реакционната способност на изпитвания химикал или конкретните характеристики на използваните клетки, свързани с растежа.

Таблица 2.

Третиране на клетки и времена за събиране за изпитването MNvit

Лимфоцити, първични клетки и клетъчни линии, третирани с цитоБ	+ S9 Краткосрочно третиране	Извършва се третиране за 3—6 часа при наличието на S9; отстраняват се S9 и средата, в която се извършва третирането; добавят се прясна среда и цитоБ; събира се след 1,5-2,0 пъти нормалната продължителност на клетъчния цикъл след началото на третирането.
	– S9 Краткосрочно третиране	Извършва се третиране за 3—6 часа; отстранява се средата, в която се извършва третирането; добавят се прясна среда и цитоБ; събира се след 1,5-2,0 пъти нормалната продължителност на клетъчния цикъл след началото на третирането.
	– S9 Разширено третиране	Извършва се третиране в продължение на 1,5—2 нормални цикъла при наличието на цитоБ; събира се в края на периода на третирането.

Клетъчни линии третирани без цитоБ
(Идентични на графици на третиране, описани по-горе, с изключение на това, че не се добавя цитоБ.)

При еднослойните култури е възможно в края на третирането с продължителност 3—6 часа да присъстват митотични клетки (които се идентифицират като кръгли и отделящи се от повърхността). Тъй като тези митотични клетки се отделят лесно, те могат да се загубят при отстраняването на средата, съдържаща изпитвания химикал. Ако има доказателство за съществено увеличаване на броя на митотичните клетки в сравнение с контролите, вероятно указващо на блокиране на митозата, тогава клетките следва да се събират чрез центрофугиране и да се добавят обратно към културите, за да се избегне загубата на клетки, които са в митоза и са подложени на риск от микроядра/хромозомни аберации в момента на събирането.

▼ **M7****Събиране на клетки и подготовка на предметните стъкла**

Всяка култура следва да се събира и обработва отделно. Подготовката на клетките може да включва хипотонично третиране, но този етап не е необходим, ако е постигнато достатъчно разстилане на клетките по друг начин. В подготовката на предметните стъкла могат да бъдат използвани различни техники, при условие че са получени висококачествени клетъчни препарати за преброяване. Клетките с интактни клетъчна мембрана и цитоплазма следва да бъдат запазени, за да се даде възможност за откриването на микроядра и (при метода с блокиране на цитокинезата) и за надеждното идентифициране на двуядрените клетки.

Предметните стъкла могат да бъдат оцветявани чрез използване на различни методи, като Giemsa или флуоресцентни специфични оцветители за ДНК. Използването на подходящи оцветители (напр. акридиново оранжево (78) или Хьохст 33258 плюс пиронин-У (79)) може да елиминира някои от артефактите, свързани с използването на оцветител, който не е специфичен за ДНК. Анти-кинетохорни антители, FISH с панцентромерни ДНК сонди или *in situ* белязване с панцентромерно-специфични праймери, заедно с подходящо контрастно оцветяване на ДНК, могат да бъдат използвани за идентифициране на съдържанието (целите хромозоми ще бъдат оцветени, докато ацентричните хромозомни фрагменти няма да бъдат) на микроядрата, ако механистичната информация за тяхното образуване представлява интерес (16) (17). Могат да бъдат използвани и други методи за разграничаване на кластогените от анеугените, ако те са се доказали като ефективни и ако са валидирани. Например за определени клетъчни линии измерванията на суб-2N ядра като хиподиплоидни, използвайки технологии като напр. анализ на изображения, цитометрия с лазерно сканиране или поточна цитометрия, също така биха могли да предоставят полезна информация (80) (81) (82). Морфологичното наблюдение на ядрата също може да предостави индикации за възможна анеуплоидия. Освен това, изпитване за метафазни хромозомни аберации, за предпочитане в същия тип клетки и с протокол със сравнима чувствителност, би могло също да бъде полезен начин за определяне дали микроядрата се дължат на разкъсване на хромозоми (като се знае, че хромозомна загуба не би била открита в изпитването за хромозомни аберации).

Анализ

Всички предметни стъкла, включително тези за разтворителя и за нетретираните (ако се използват) и положителните контроли, следва да се кодират независимо преди микроскопския анализ на честотата на микроядрата. Когато се използва автоматизирана система за преброяване, например поточна цитометрия, цитометрия с лазерно сканиране или анализ на изображения, следва да се използват подходящи техники за контрол на всяко изместване или дрейф, Независимо че за преброяване на микроядрата се използва автоматична платформа, паралелно следва да се оценяват CBPI, RI, RPD, или RICC.

При култури, третирани с цитоБ, честотата на микроядрата следва да бъде анализирана при поне 2 000 двуядрени клетки на концентрация и контрола (83), разделени поравно между повторенията, ако се използват повторения. В случай на една култура на доза без повторение (вж. точка 28), в тази култура следва да бъдат преброени поне 2 000 двуядрени клетки на култура (83). Ако за преброяване при всяка концентрация са налични съществено по-малко от 1 000 двуядрени клетки на култура (за култури с повторения), или по-малко от 2 000 (при една култура без повторение), и ако не е открито съществено увеличение на микроядрата, изпитването следва да бъде повторено с използване на повече клетки или при по-малко цитотоксични концентрации, което от двете е уместно. Трябва да се внимава да не се преброяват двуядрени клетки с неправилна форма или такива, в които двете ядра се различават в голяма степен по размер. Освен това, двуядрените клетки не следва да се бъркат с недобре разнесените многоядрени клетки. Клетките, които съдържат повече от две основни ядра, следва да не бъдат анализирани за наличието на микроядра, тъй като базовата честота на микроядрата може да бъде по-висока при тези клетки (84). Преброяването на едноядрените клетки е приемливо, ако е доказано,

▼ **M7**

че изпитваният химикал оказва влияние върху активността на цитоБ. В подобни случаи може да е полезно изпитване без цитоБ с повторение. Преброяването на едноядрени клетки в допълнение към двудрените клетки може да предостави полезна информация (85) (86), но не е задължително.

При клетъчни линии, изпитвани без третиране с цитоБ, микроядрата следва да се преброят поне в 2 000 клетки на изпитвана концентрация и контрола (83), разделени поравно между повторенията, ако се използват повторения. Когато се използва култура без повторение на концентрация (вж. точка 28), в тази култура без повторение следва да се преброят най-малко 2 000 клетки на култура. Ако за преброяване при всяка концентрация са налични съществено по-малко от 1 000 клетки на култура (за култури с повторения) или по-малко от 2 000 (при една култура без повторение), и ако не е открито съществено увеличение на микроядрата, изпитването следва да бъде повторено с използване на повече клетки или при по-малко цитотоксични концентрации, което от двете е уместно.

Когато се употребява цитоБ, за оценка на пролиферацията на клетките (вж. допълнение 2) следва да бъдат определени СВРІ или RІ, като се използват поне 500 клетки на култура. Когато третиранията се извършват в отсъствие на цитоБ от съществено значение е да бъдат предоставени доказателства, че клетките в културата са преминали през делене, както е обсъдено в точки 24—28.

Пригодност на лабораторията

За да се натрупа достатъчно опит по отношение на изследването преди използването му за рутинно изпитване, лабораторията следва да е извършила поредица опити с положителни референтни химикали, действащи чрез различни механизми (най-малко по един със и един без метаболитно активиране, както и един действащ чрез анеугенен механизъм, избрани от химикалите, изброени в таблица 1) и различни отрицателни контроли (включително нетретираны култури и различни разтворители/носители). Положителният и отрицателният отклик при контролите следва да съответства на литературата. Това не се прилага за лаборатории, които разполагат с опит, т.е. които разполагат с налична база данни за предходни периоди, както е определено в точки 49—52.

Подбрани химикали за положителни контроли (вж. таблица 1) следва да бъдат изследвани с краткосрочно и дългосрочно третиране в отсъствието на метаболитно активиране, и също така с краткосрочно третиране с метаболитно активиране за доказване на пригодността за откриване на клас-тогенни и анеугенни химикали и за определяне на ефективността на системата за метаболитно активиране и за доказване на целесъобразността на процедурите за преброяване (микроскопски визуален анализ, поточна цитометрия, цитометрия с лазерно сканиране или анализ на изображения). Следва да бъде избран обхват от концентрации на химикалите от подбора така, че да се получават възпроизводими и свързани с концентрацията увеличения над фоните стойности с цел да се демонстрират чувствителността и динамичният обхват на системата за изпитване.

Данни за контролите за предходни периоди

Лабораторията следва да установи:

- Размах и разпределение при положителните контроли от предходни периоди,
- Размах и разпределение при отрицателните (без третиране и за разтворител) контроли от предходни периоди.

При първото придобиване на данни за разпределението при отрицателните контроли от предходни периоди паралелните отрицателни контроли следва да бъдат съобразени с публикуваните данни за отрицателните контроли, когато такива са налице. При добавяне на повече опитни данни към разпределението при контролите паралелните отрицателни контроли следва в идеалния случай да бъдат в рамките на граници за контрол 95 % на това разпределение (87) (88). Базата данни с отрицателни контроли от предходни периоди на лабораторията следва първоначално да се създаде с минимум 10 опита, но е за предпочитане тя да се състои най-малко от 20 опита, проведени при сравними опитни условия. Лабораториите трябва да

▼ **M7**

използват методи за контрол на качеството, като например контролни карти (напр. С-карти или карти за средна стойност (\bar{X} -bar) (88)), за определяне на варирането на данните им за положителните и отрицателните контроли, и за доказване, че методологията е „под контрол“ в техните лаборатории (83). В литературата (87) могат да се намерят допълнителни препоръки относно начина на създаване и използване на данни от предходни периоди (т.е. критерии за включване и изключване на данни в данните за предходни периоди и критериите за приемливост за даден опит).

Всички промени в опитния протокол следва да бъдат разглеждани от гледна точка на съгласуваността на данните със съществуващите бази данни на дадената лаборатория за контролите за предходни периоди. Всички значителни несъответствия следва да водят до създаването на нова база данни за контролите за предходни периоди.

Данните за отрицателните контроли следва да включват броя на клетките с микроядра при култури без повторение или сбора за културите с повторения, както е описано в точка 28. Паралелните отрицателни контроли в идеалния случай следва да бъдат в рамките на граници за контрол 95 % от разпределението от базата данни на дадената лаборатория за отрицателните контроли за предходни периоди (87) (88). Когато данните за паралелните отрицателни контроли попадат извън 95 %-ните граници за контрол, те могат да бъдат приемливи за включване в разпределението при контролите от предходни периоди, при условие че тези данни не са екстремални стойности, силно различаващи се от нормалните, и има доказателства, че системата за изпитване е „под контрол“ (вж. точка 50), както и доказателства за липса на техническа или човешка грешка.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Представяне на резултатите

Ако се използва техниката на блокиране на цитокинезата, в оценката на индуцирането на микроядра се използват само честотите на двудрените клетки с микроядра (независимо от броя на микроядрата в една клетка). Преброяването на броя на клетките с едно, две или повече микроядра може да се протоколира отделно и може да предостави полезна информация, но не е задължително.

Следва да се определят паралелните измервания на цитотоксичността и/или цитостазата за всички третирани култури, за отрицателните и положителните контролни култури (16). Следва да бъдат изчислени СВРІ или RІ за всички третирани и контролни култури като измервания на забавяне на клетъчния цикъл, когато се използва методът на блокиране на цитокинезата. В отсъствие на цитоБ следва да бъдат използвани RPD или RICC (вж. допълнение 2).

Следва да се предоставят данни за отделните култури. В допълнение към това всички данни следва да бъдат обобщени в табличен вид.

Критерии за приемливост

Приемливостта на дадено изпитване се основава на следните критерии:

- паралелната отрицателна контрола се смята за приемлива за допълване към базата данни на дадената лаборатория за отрицателните контроли за предходни периоди, както е описано в точка 50.
- Паралелните положителни контроли (вж. точка 50) трябва да предизвикват отклици, които са съвместими с генерираните в базата данни за положителните контроли за предходни периоди, и да генерират статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола.
- Критериите за клетъчна пролиферация в контролата на разтворител трябва да бъдат спазени (точки 25—27).
- Всичките опитни условия са били подложени на изпитване, освен ако едно от тях е довело до положителни резултати (точки 36—40).
- Достатъчен брой клетки и концентрации са годни за анализ (точки 28 и 44—46).

▼ **M7**

- Критериите за избор на най-високата концентрация са съвместими с описаните в точки 24—31.

Оценка и тълкуване на резултатите

При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно положителен, ако в някое от изследваните опитни условия (вж. точки 36—39):

- при най-малко една от изпитваните концентрации се наблюдава статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола (89),
- увеличението е свързано с дозата при поне едно опитно условие, при оценка, извършена с подходящ трендов тест (вж. точка 28),
- някой от резултатите е извън разпределението на данните за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. на основата на разпределение на Поасон с граници за контрол 95 %; вж. точка 52).

Ако всички тези критерии са изпълнени се смята, че изпитваният химикал може да предизвика хромозомни разкъсвания и/или загуба или допълнително наличие в тази система за изпитване. Препоръки за най-подходящите статистически методи могат да се намерят в литературните източници (90) (91) (92).

При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно отрицателен, ако във всички изследвани опитни условия (вж. точки 36—39):

- в никоя от изпитваните концентрации не се наблюдава статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола,
- няма увеличение, свързано с дозата при оценка, извършена с подходящ трендов тест,
- всички резултати са в рамките на разпределението на данните за отрицателните контроли от предходни периоди (напр. на основата на разпределение на Поасон с граници за контрол 95 %; вж. точка 52).

Тогава се смята, че изпитваният химикал не може да предизвика хромозомни разкъсвания и/или загуба или допълнително наличие в тази система за изпитване. Препоръки за най-подходящите статистически методи могат да се намерят в литературните източници (90) (91) (92).

Няма изискване за потвърждаване на ясно положителен или ясно отрицателен отклик.

В случай че откликът не е нито ясно отрицателен, нито ясно положителен, както е описано по-горе, или с цел подпомагане на установяването на биологичната относимост на даден резултат, данните следва да се оценяват чрез експертна оценка и/или чрез допълнителни изследвания. Преброяването на допълнителни клетки (когато е уместно) или извършването на опит с повторение с възможност за използване на изменени опитни условия [напр. интервал на разполагане на концентрациите, други условия на метаболитно активиране (т.е. концентрация на S9 или производ на S9)] може да се окажат от полза.

В редки случаи дори след допълнителни изследвания наборът от данни не позволява стигането до заключение за положителни или отрицателни резултати и следователно се заключава, че е неясен.

Изпитваните химикали, които индуцират микроядра в изпитването MNvit, постигат това, като предизвикват хромозомни разкъсвания, хромозомни загуби или комбинация от двете. Последващият анализ, при който се използват антикинетохорни антитела, специфични за центромерата *in situ* сонди или други методи, може да бъде използван за определяне дали механизъмът за индуциране на микроядра се дължи на кластогенна и/или анеугенна активност.

▼ M7**Протокол от изпитването**

Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал:

- източник, номер на партидата, крайна дата за употреба, ако има такава;
- стабилност на самия изпитван химикал, ако е известна;
- реакционна способност на изпитвания химикал с разтворителя/носителя или средата за клетъчните култури.
- разтворимост и стабилност на изпитвания химикал в разтворител, ако са известни.
- измерване на рН, осмолалитет и утайка в средата за отглеждане, към която е добавен изпитваният химикал, когато е уместно.

Вещество с една съставка:

- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- химична идентификация, като наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, SMILES или InChI код, структурна формула, чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и др.

Вещество с повече съставки, UVCB и смеси:

- характеризирани, доколкото е възможно, от химическата идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Разтворител:

- обосновка на избора на разтворител;
- процентно съдържание на разтворителя в окончателната среда за отглеждане.

Клетки:

- тип и източник на използваните клетки;
- дали използваният тип клетки е подходящ;
- за клетъчни линии — отсъствие на микоплазма;
- за клетъчни линии — информация за продължителността на клетъчния цикъл или индекса на пролиферация;
- при използване на лимфоцити — пол на кръвните донори, възраст и всякаква относима информация по отношение на донор, цяла кръв или изолирани лимфоцити, използван митоген;
- нормално (отрицателна контрола) време на клетъчен цикъл;
- за клетъчни линии — брой пасажи, ако е наличен;
- за клетъчни линии — методи за поддържане на клетъчните култури;
- за клетъчни линии — модален брой на хромозомите;

▼ M7*Условия на изпитване:*

- идентичност на блокера на цитокинезата (напр. цитоБ), ако се използва такъв, неговата концентрация и времетраене на експозицията на клетките;
- концентрация на изпитвания химикал, изразена като крайна концентрация в средата за отглеждане (напр. μg или mg/ml или mM от среда за отглеждане);
- обосновка за избора на концентрации и броя на култури, включително данни за цитотоксичността и граници на разтворимост;
- състав на средите, концентрация на CO_2 , ако е приложимо, влажност;
- концентрация (и/или обем) на разтворителя и изпитвания химикал, добавени в средата за отглеждане;
- температура и време на инкубация;
- времетраене на третирането;
- време на събиране след третирането;
- гъстота на клетките при посяване, ако е приложимо;
- тип и състав на системата за метаболитно активиране (източник на S9, метод на приготвяне на S9 микса, концентрация или обем на S9 микса и S9 в окончателната среда за отглеждане, контрол на качеството на S9, напр. ензимна активност, стерилност, метаболитен капацитет);
- химикали за положителни и отрицателни контроли, крайни концентрации и продължителности на третиранията и периоди на възстановяване;
- методи на подготовка на предметните стъкла и използвана техника на оцветяване;
- критерии за преброяване на клетки с микроядра (подбор на годни за анализ клетки и идентификация на микроядрата);
- брой на анализирани клетки;
- методи за измерване на цитотоксичността;
- всякаква допълнителна информация, относима към цитотоксичността и използвания метод;
- критерии за считане на изследванията за положителни, отрицателни или неясни;
- използван(и) метод(и) за статистически анализ;
- методи, като използване на анти-кинетохорни антители или панцентромерни сонди, за определяне дали микроядрата съдържат цели хромозомни фрагменти, ако е приложимо;
- методи, използвани за определяне на pH, осмолалитета и утайката.

Резултати:

- определяне на приемливи клетки за анализ;
- за клетъчни линии, в отсъствие на цитоБ — броят на третираните клетки и броят на събраните клетки за всяка култура;

▼ M7

- използвано измерване на цитотоксичността, напр. CBPI или RI в случай че се използва метод на блокиране на цитокинезата; RICC или RPD, когато не се използват методи на блокиране на цитокинезата; други наблюдения (напр. клетъчно сливане, апоптоза, некроза, преброяване на метафази, честота на двудрените клетки);
- признаци на утаяване и час на определяне;
- данни за pH и осмолалитета на средата на третиране, ако са определени;
- разпределението на едноядрените, двудрените и многоядрените клетки, ако се използва метод на блокиране на цитокинезата;
- брой на клетките с микроядра, даден отделно за всяка третирана и контролна култура, като по целесъобразност се посочва дали са от двудрени или едноядрени клетки;
- зависимостта концентрация—отклик, където е възможно;
- данни от паралелни отрицателни (разтворител) и положителни контроли (концентрации и разтворители);
- данни от отрицателни (разтворител) и положителни контроли за предходни периоди, с размах, средни стойности и стандартно отклонение и 95 % граници за контрол за разпределението, както и брой данни;
- статистически анализ; р-стойности, ако има такива;

Обсъждане на резултатите.

Заклучения.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 1-4.
- (3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 3-15.
- (4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, Vol. 43/172-173, pp. 233-246.
- (5) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 167-172.
- (6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, Vol. 2/5, pp. 1084-1104.
- (7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*, Vol. 161/2, pp. 193-198.
- (8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 13/1, pp. 34-43.

▼ M7

- (9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research*, Vol. 234/5, pp. 9-20.
- (10) Miller, B.M. *et al.* (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297-302.
- (11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis*, Vol. 8/4, pp. 329-334.
- (12) Migliore, L. *et al.* (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research*, Vol. 319/3, pp. 205-213.
- (13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 519-525.
- (14) Eastmond, D.A., D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research*, Vol. 322/1, pp. 9-20.
- (15) Marshall, R.R. *et al.* (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research*, Vol. 372/2, pp. 233-245.
- (16) Zijno, P. *et al.* (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 372/2, 211-219.
- (17) Kirsch-Volders *et al.* (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research*, Vol. 540/2, pp. 153-163.
- (18) Глава Б.10 от настоящото приложение: *Тест in vitro за хромозомни аберации при бозайници.*
- (19) Lorge, E. *et al.* (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 13-36.
- (20) Clare, G. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 37-60.
- (21) Aardema, M.J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 61-87.
- (22) Wakata, A. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 88-124.
- (23) Oliver, J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 125-152.
- (24) Albertini, S. *et al.* (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 187-208.
- (25) Miller, B. *et al.* (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 45-59.

▼ **M7**

- (26) Miller, B. *et al.* (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research*, Vol. 410, pp. 81-116.
- (27) Kalweit, S. *et al.* (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches. *Mutation Research*, Vol. 439/2, pp. 183-190.
- (28) Kersten, B. *et al.* (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 445/1, pp. 55-71.
- (29) von der Hude, W. *et al.* (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Research*, Vol. 468/2, pp. 137-163.
- (30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 123-134.
- (31) Matsushima, T. *et al.* (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, Vol. 14/6, pp. 569-580.
- (32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 1-152.
- (33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Research*, Vol. 702/2, pp. 139-147.
- (34) Hashimoto K. *et al.* (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 59/1, pp. 28-36.
- (35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 373-384.
- (36) Zhang, L.S. *et al.* (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters*, Vol. 347/3-4, pp. 105-115.
- (37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November 2006, На разположение на адрес: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. На разположение на адрес: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (39) Corvi, R. *et al.* (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis*, Vol 23/4, pp. 271-283.
- (40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research*.

▼ M7

- (41) Scott, D. *et al.* (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research*, Vol. 257/2, pp. 147-205.
- (42) Morita, T. *et al.* (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, Vol. 268/2, pp. 297-305.
- (43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.
- (44) Long, L.H. *et al.* (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research*, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.
- (45) Nesslany, F. *et al.* (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, pp. 439-452.
- (46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 147/1-2, pp. 29-36.
- (47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research*, Vol. 392, pp. 11-18.
- (48) Payne, C.M. *et al.* (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825-840.
- (49) Bazin, E. *et al.* (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, pp. 251-259.
- (50) Le Hegarat, L. *et al.* (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555-560.
- (51) Josse, R. *et al.* (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 295-304.
- (52) Ehrlich, V. *et al.* (2002). Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, Vol. 17/3, pp. 257-260.
- (53) Knasmüller, S. *et al.* (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, Vol. 198/1-3, pp. 315-328.
- (54) Gibson, D.P. *et al.* (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 61-70.
- (55) Bonassi, S. *et al.* (2001). HUMAN MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 37/1, pp. 31-45.
- (56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.
- (57) Ong, T.-m. *et al.* (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55-65.

▼ M7

- (58) Elliott, B.M. *et al.* (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, Vol. 7, pp. 175-177.
- (59) Matsushima, T. *et al.* (1976). „A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems“, in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*. de Serres, F.J. *et al.* (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28, pp. 51-59.
- (61) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). На разположение на адрес: <http://www.pops.int/>
- (62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol.190/3, pp. 225-8.
- (63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). „CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids“, in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.
- (64) Zamora, P.O. *et al.* (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.
- (65) Asakura, M. *et al.* (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.
- (66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, Vol. 285/1, pp. 35-44.
- (67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 521/1-2, pp. 103-112.
- (68) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2004). Corrigendum to „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group“. *Mutation Research*, 564, 97-100.
- (69) Lorge, E. *et al.* (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research*, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.
- (70) Surralls, J. *et al.* (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 341/3, pp. 169-184.
- (71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, pp. 86-87.
- (72) Pfuhrer, S. *et al.* (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 101-107.
- (73) OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. На разположение при поискване.

▼ M7

- (74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, pp. 32-56.
- (75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.
- (76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>.
- (77) Sobol, Z. *et al.* (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research*, Vol.746/1, pp. 29-34.
- (78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 241-247.
- (79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269-275.
- (80) Bryce, S.M. *et al.* (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, pp. 280–286.
- (81) Nicolette, J. *et al.* (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 355–362.
- (82) Shi, J., R. Bezabhe, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33-40.
- (83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris.
- (84) Fenech, M. *et al.* (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 534/1-2, pp. 65-75.
- (85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193-8.
- (86) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, Vol. 85/8, pp. 873-99.
- (87) Hayashi, M. *et al.* (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, pp. 87-90.
- (88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). „*In vitro* micronucleus test“, in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463-467.
- (90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.
- (91) Galloway, S.M. *et al.* (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

▼ M7

- (92) Richardson, C. *et al.* (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

- (93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼ M7*Допълнение 1*

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Анеуген: всеки химикал или процес, който води до анеуплоидия в клетките или организмите чрез взаимодействие с компонентите на митотичния и мейотичния цикъл на клетъчно делене.

Анеуплоидия: всяко отклонение от обичайния диплоиден (или хаплоиден) брой на хромозомите с една или повече от една хромозома, но не и с цял набор (или набори) от хромозоми (полиплоидия).

Апoptоза: програмирана клетъчна смърт, характеризираща се с редица етапи, водещи до разпадане на клетките на мембраносвързани частици, които впоследствие се елиминират чрез фагоцитоза или фрагментация.

Клетъчна пролиферация: увеличение на броя на клетките в резултат на митотично клетъчно делене.

Центромера: областта от ДНК в хромозомата, в която се свързват двете хроматиди и върху която двете кинетохори са прикрепени една до друга.

Химикал: вещество или смес.

Концентрации: отнася се за крайните концентрации на изпитвания химикал в средата за отглеждане.

Кластоген: всеки химикал, който причинява структурни хромозомни аберации в популации от клетки или еукариотни организми.

Цитокинеза: процесът на клетъчно делене, който следва непосредствено след митозата, и в резултат на който се образуват две дъщерни клетки, всяка от които съдържа едно ядро.

Индекс на пролиферация при блокиране на цитокинезата (СВРІ): отношението на клетките от второто делене в третираната популация спрямо нетретираната контрола (вж. допълнение 2 за формула).

Цитостаза: потискане на растежа на клетките (вж. допълнение 2 за формула).

Цитотоксичност: за изследванията, обхванати от настоящия метод за изпитване, извършвани в присъствието на цитохалазин Б, цитотоксичността се определя като намаляване на индекса на пролиферация при блокиране на цитокинезата (СВРІ) или на индекса на репликация (RI) на третираните клетки в сравнение с отрицателната контрола (вж. точка 26 и допълнение 2).

за изследванията, обхванати от настоящия метод за изпитване, извършвани в отсъствието на цитохалазин Б, цитотоксичността се определя като намаляване на относителното удвояване на популации (RPD) или относителния ръст в количеството клетки (RICC) на третираните клетки в сравнение с отрицателната контрола (вж. точка 27 и допълнение 2).

Генотоксичен: общ термин, обхващащ всички видове увреждания на ДНК или на хромозоми, включително разкъсвания, делеции, адукти, изменения на нуклеотиди и връзки, прегрупирания, генни мутации, хромозомни аберации и анеуплоидия. Не всички типове генотоксични ефекти водят до мутации или трайно увреждане на хромозомите.

Интерфазни клетки: клетки, които не са в митоза.

Кинетохора: структура, съдържаща белтък, свързана с центромерата на хромозомата, с която нишките на делителното вретено се свързват по време на клетъчното делене, като така позволяват методично придвижване на дъщерните хромозоми към полюсите на дъщерните клетки.

▼ M7

Микроядро: малки ядра, отделни от главното ядро на клетките и в допълнение към него, получени по време на телофазата на митозата или мейозата чрез изоставачи хромозомни фрагменти или цели хромозоми.

Митоза: делене на клетъчното ядро, обикновено разделено на профаза, прометафаза, метафаза, анафаза и телофаза.

Митотичен индекс: отношението на клетките в метафаза, разделени на общия брой клетки, наблюдавани в дадена клетъчна популация; показател за степента на пролиферация на тази популация.

Мутагенен: води до наследствена промяна на ДНК последователност(и) на базовите двойки в гени, или на структурата на хромозоми (хромозомни аберации).

Неспособност за отделяне: неспособност на двойката хроматиди да се отделят една от друга и правилно да се разделят, за да се обособят в развиващите се дъщерни клетки, в резултат на което се получават дъщерни клетки с аномален брой хромозоми.

Статус на p53: Белтъкът p53 е включен в регулирането на клетъчния цикъл, апоптозата и поправката на ДНК. Клетките с дефицит на функционалния белтък p53, неспособни да блокират клетъчния цикъл или да елиминират увредените клетки чрез апоптоза или чрез други механизми (напр. предизвикване на поправка на ДНК), свързани с функциите на p53, в отговор на увреждане на ДНК, следва теоретично да са по-податливи на генни мутации или хромозомни аберации.

Полипloidия: бройни хромозомни аберации в клетки или организми, включващи цял набор(и) от хромозоми в противовес на отделна хромозома или хромозоми (анеупloidия).

Индекс на пролиферация (PI): метод за измерване на цитотоксичността, когато не се използва цитоБ (вж. Допълнение 2 за формула).

Относителен ръст в количеството клетки (RICC): метод за измерване на цитотоксичността, когато не се използва цитоБ (вж. Допълнение 2 за формула).

Относително удвояване на популации (RPD): метод за измерване на цитотоксичността, когато не се използва цитоБ (вж. Допълнение 2 за формула).

Индекс на репликация (RI): отношението на циклите на клетъчно делене, през които е преминала третирана култура, към нетретираната контрола по време на периода на експозиция и възстановяване (вж. Допълнение 2 за формула).

S9 фракция от черен дроб: супернатант от хомогенат на черен дроб след центрофугиране при 9 000 g, т.е. необработен екстракт от черен дроб.

S9 микс: микс от S9 фракцията от черен дроб и кофактори, необходими за метаболитна ензимна активност.

Контрола на разтворител: общ термин за определяне на контролните култури, които са само на разтворителя, който се използва за разтваряне на изпитвания химикал.

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

Нетретирана контрола: култури, които не се третират (т.е. без изпитвания химикал и без разтворител), но се обработват паралелно по същия начин като културите, които се третират с изпитвания химикал.

▼ M7

Допълнение 2

ФОРМУЛИ ЗА ОЦЕНКА НА ЦИТОТОКСИЧНОСТТА

Когато се използва цитоБ, оценката на цитотоксичността следва да бъде основана на **индекса на пролиферация при блокиране на цитокинезата (СВРІ)** или на **индекса на репликация (RІ)** (17) (69). СВРІ посочва средния брой ядра на клетка и може да бъде използван за изчисляване на пролиферацията на клетките. RІ посочва относителния брой на клетъчните цикли за клетка по време на периода на експозиция на цитоБ в третираните култури в сравнение с контролните култури и може да бъде използван за изчисляване на % на цитостаза:

$$\% \text{ на цитостаза} = 100 - 100\{(\text{СВРІ}_T - 1) \div (\text{СВРІ}_C - 1)\}$$

и:

T = култура за изпитване с третирания химикал

C = контролна култура

където:

$$\text{СВРІ} = \frac{((\text{бр. едноклеточни клетки}) + (2 \times \text{бр. двуклеточни клетки}) + (3 \times \text{бр. многоклеточни клетки}))}{(\text{Общ бр. клетки})}$$

Поради това СВРІ на стойност 1 (всички клетки са едноклеточни) е еквивалентен на 100 % цитостаза.

Цитостаза = 100-RІ

$$\text{RІ} = \frac{((\text{бр. двуклеточни клетки}) + (2 \times \text{бр. многоклеточни клетки})) / (\text{Общ бр. клетки})_T}{((\text{бр. двуклеточни клетки}) + (2 \times \text{бр. многоклеточни клетки})) / (\text{Общ бр. клетки})_C} \times 100$$

T = третираните култури

C = контролни култури

Поради това RІ на стойност 53 % означава, че в сравнение с броя на клетките, които са претърпели делене, за да образуват двуклеточни и многоклеточни клетки в контролната култура, само 53 % от този брой са претърпели делене в третираната култура, т.е. 47 % цитостаза.

Когато не се използва цитоБ, се препоръчва оценяване на цитотоксичността въз основа на **относителния ръст в количеството клетки (RІСС)** или на **относителното удвояване на популации (RРD)** (69), тъй като и при двете се отчита делът на популацията на клетки, които са претърпели делене.

$$\text{RІСС}(\%) = \frac{(\text{Увеличение в бр. клетки в третираните култури(краен - начален)})}{(\text{Увеличение в бр. клетки в контролни култури(краен - начален)})} \times 100$$

$$\text{RРD}(\%) = \frac{(\text{бр. удвоявания на популациите в третираните култури})}{(\text{бр. удвоявания на популациите в контролни култури})} \times 100$$

където:

Удвояване на популации = $[\log(\text{брой на клетките след третиране} \div \text{първоначален брой на клетките})] \div \log 2$

Поради това RІСС или RРD на стойност 53 % показва 47 % цитотоксичност/цитостаза.

▼ M7

Чрез използване на **индекса на пролиферация (PI)** цитотоксичността може да бъде оценена чрез преброяване на броя на клонингите, които се състоят от 1 клетка (c11), 2 клетки (c12), 3 до 4 клетки (c14) и 5 до 8 клетки (c18)

$$PI = \frac{((1 \times c11) + (2 \times c12) + (3 \times c14) + (4 \times c18))}{(c11 + c12 + c14 + c18)}$$

PI е използван като ценен и надежден параметър за цитотоксичността също и по отношение на клетъчни линии, култивирани *in vitro* в отсъствието на цитоБ (35) (36) (37) (38) и може да се разглежда като полезен допълнителен параметър.

Във всички случаи броят на клетките преди третирането следва да е един и същ при културите, подлежащи на третиране, и при отрицателните контролни култури.

Въпреки че RCC (т.е. брой на клетките в третираните култури/брой на клетките в контролните култури) е бил използван като параметър за цитотоксичност в миналото, той вече не се препоръчва, тъй като може да подцени цитотоксичността.

Когато се използват автоматични системи за преброяване, например поточна цитометрия, цитометрия с лазерно сканиране или анализ на изображения, броят на клетките във формулата може да бъде заместен с броя на ядрата.

В отрицателни контролни култури удвояването на популации или индексът на репликация следва да бъдат съвместими с изискването за пробовземане на клетки след третиране във време, равняващо се на около 1,5-2,0 нормални клетъчни цикъла.

▼ M3

**Б.50. КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: ИЗСЛЕДВАНЕ НА
ЛОКАЛНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ: DA****ВЪВЕДЕНИЕ**

1. Указанията за изпитването на химикали на ОИСП и методите за изпитване на ЕС периодично се преразглеждат с оглед на научния прогрес, промяната на регулаторните нужди и съображенията, свързани с хуманното отношение към животните. Първият метод за изпитване (МИ) (Б.42) за определянето на кожна сенсibiliзация при мишки — изследването на локалните лимфни възли (LLNA, Указание за изпитване 429 на ОИСП) — бе преработен (1). Публикувана е подробна информация за валидирането на LLNA и е направен преглед на съответните научни трудове (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). При LLNA се използва радиоизотопен тимидин или йод за измерване на пролиферацията на лимфоцитите и поради това изследването има ограничена употреба, когато придобиването, използването или обезвреждането на радиоактивни вещества е проблематично. LLNA: DA (разработено от Daicel Chemical Industries, Ltd.) е нерадиоактивно изменение на LLNA, което определя количествено съдържанието на аденозин трифосфат (АТР) чрез биолуминесценция като индикатор за пролиферацията на лимфоцитите. Методът за изпитване LLNA: DA е валидиран, преработен и препоръчван от международна група за партньорска оценка, тъй като се счита за полезен за идентифициране на химикалите, които са кожни сенсibiliзатори, както и на химикалите, които не предизвикват кожна сенсibiliзация (10) (11) (12) (13). Този МИ е предназначен за оценка на потенциала на химикалите (вещества и смеси) да предизвикват кожна сенсibiliзация при животни. В глава Б.6 от настоящото приложение и в Указание за изпитване 406 на ОИСП се използват изследвания върху морски свинчета, по-специално максимизиращ тест върху морски свинчета и тест на Buehler (14). LLNA (глава Б.42 от настоящото приложение; Указание за изпитване 429 на ОИСП) и двете му нерадиоактивни изменения: LLNA: DA (глава Б.50 от настоящото приложение; Указание за изпитване 442 А на ОИСП) и LLNA: BrdU-ELISA (глава Б.51 от настоящото приложение; Указание за изпитване 442 Б на ОИСП) — всички те предоставят предимство спрямо изследванията върху морски свинчета в Б.6 и Указание за изпитване 406 на ОИСП (14), що се отнася до намаляването на и усъвършенстването при използването на животни.
2. Подобно на LLNA, LLNA: DA проучва индукционната фаза при кожна сенсibiliзация и осигурява количествени данни, подходящи за оценяване на зависимостта доза—отговор. Освен това способността за откриване на кожни сенсibiliзатори без да е необходимо използването на радиомаркер за ДНК елиминира потенциалната възможност за професионална експозиция на радиоактивност, както и проблемите, свързани с обезвреждането на отпадъци. Това от своя страна може да даде възможност за повишаване на използването на мишки за откриване на кожни сенсibiliзатори, което още повече би могло да намали използването на морски свинчета за изпитване на потенциала за кожна сенсibiliзация (т.е. Б.6; Указание за изпитване 406 на ОИСП) (14).

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

3. Използваните определения са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

4. LLNA: DA е модифициран метод LLNA за определяне на химикалите, които са потенциални кожни сенсibiliзатори, с известни ограничения. Това не означава непременно, че при всички случаи следва да се използва LLNA: DA вместо LLNA или изследванията върху морски свинчета (т.е. Б.6, Указание за изпитване 406 на ОИСП) (14), а по-скоро че изпитването е равностойно и може да бъде използвано като алтернатива, при която обикновено положителните и отрицателните резултати вече не изискват допълнително потвърждаване (10) (11). Лабораторията, провеждаща изпитването, следва да вземе предвид цялата налична информация за изпитваното вещество преди провеждането на изпитването. Тази информация ще включва идентичността и

▼ M3

химичната структура на изпитваното вещество; неговите физико-химични свойства; резултатите от всякакви други *in vitro* или *in vivo* токсикологични изпитвания на изпитваното вещество; и токсикологични данни за структурно свързани вещества. Тази информация следва да се вземе предвид, за да се определи дали LLNA: DA е подходящо за изпитваното вещество (с оглед на несъвместимостта на ограничен брой видове химикали с LLNA: DA [вж. точка 5] и като помощно средство при избора на доза.

5. LLNA: DA е *in vivo* метод и вследствие на това няма да доведе до преустановяване на използването на животни при оценяването на алергичната контактна сенсibiliзираща активност. Той обаче има потенциала да намали използването на животни за тази цел в сравнение с изследванията върху морски свинчета (Б.6; Указание за изпитване 406 на ОИСП) (14). Освен това LLNA: DA предлага съществено усъвършенстване (по-малко болка и страдание) на начина, по който животните се използват за изпитване на алергичната контактна сенсibiliзация, тъй като за разлика от Б.6 и Указание за изпитване 406 на ОИСП LLNA: DA не изисква да се разкрие кожна свръхчувствителност след предизвикване. Въпреки предимствата на LLNA: DA пред Б.6 и Указание за изпитване 406 на ОИСП (14), съществуват определени ограничения, които могат да доведат до необходимост от използване на Б.6 или на Указание за изпитване 406 на ОИСП (напр. изпитването на определени метали, фалшиво положителни резултати при определени кожни дразнителни) [например някои видове повърхностноактивни вещества] (6) (1 и глава Б.42 от настоящото приложение) или разтворимостта на изпитваното вещество). Освен това химичните класове или вещества, съдържащи функционални групи, за които е доказано, че водят до възможно объркване (16), могат да доведат до необходимост от използване на изследванията върху морски свинчета (т.е. Б.6; Указание за изпитване 406 на ОИСП (14)). В допълнение се препоръчва установените за LLNA ограничения (1 и глава Б.42 от настоящото приложение) да бъдат прилагани и по отношение на LLNA: DA (10). Освен това използването на LLNA: DA може да не е подходящо за изпитвани вещества, които влияят на нивата на аденозин трифосфат (АТФ) (напр. вещества, които действат като инхибитори на АТФ), или такива, които влияят на точното измерване на вътреклетъчния АТФ (напр. наличието на АТФ-разграждащи ензими, наличието на извънклетъчен АТФ в лимфния възел). С изключение на тези установени ограничения LLNA: DA следва да се прилага за изпитване на всички вещества, освен ако съществуват свързани с тези вещества свойства, които могат да повлияят на точността на LLNA: DA. Освен това следва да бъде обърнато внимание на възможността за гранични положителни резултати, когато са получени стойности на стимулационния индекс (SI) между 1,8 и 2,5 (вж. точка 31—32). Това се основава на базата данни от валидирането, състояща се от 44 вещества, които използват $SI \geq 1,8$ (вж. точка 6), за които изследването LLNA: DA: правилно е определило всички 32 сенсibiliзатора при LLNA, но неправилно е определило три от 12-те вещества, които не са сенсibiliзатори при LLNA със стойности на SI между 1,8 и 2,5 (т.е. гранични положителни) (10). При все това, тъй като същият набор от данни беше използван за определяне на стойностите на SI и изчисляване на прогнозните способности на изпитването, посочените резултати могат да представляват надценяване на реалните прогнозни способности.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

6. Основният принцип, залегнал в LLNA: DA, е, че сенсibiliзаторите предизвикват пролиферация на лимфоцитите в лимфните възли, дрениращи мястото на прилагане на изпитваното вещество. Тази пролиферация е пропорционална на дозата и на действието на приложения алерген и осигурява лесен начин за получаване на количествено измерване на сенсibiliзацията. Пролиферацията се измерва чрез сравняване на средната пролиферация във всяка изпитвана група със средната пролиферация в третираната с носителя контролна група (КН). Съотношението на средната пролиферация във всяка третирана група спрямо тази в паралелната третирана с носителя контролна група, наречено SI, е предварително определено и следва да бъде $\geq 1,8$, за да може изпитваното вещество да бъде оценено по-нататък като потенциален кожен сенсibiliзатор. Описаните тук процедури се основават

▼ M3

на измерването на съдържанието на АТР чрез използването на биолуминесценция (за която е известно, че корелира с броя на живите клетки) (17) за показване на увеличени брой на пролифериращите клетки в дренажите аурикуларни (ушни) лимфни възли (18) (19). Биолуминесцентният метод използва ензима луцифераза за катализиране на образуването на светлина от АТР и луциферин съгласно следната реакция:



Интензитетът на излъчваната светлина е в линейна зависимост от концентрацията на АТР и се измерва чрез използването на луминометър. Изпитването луциферин—луцифераза е чувствителен метод за количествено определяне на АТР и се използва в широк кръг от приложения (20).

ОПИСАНИЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

Избор на животински вид

7. Видът животно, избран за това изследване, е мишката. Изследванията за валидиране на LLNA: DA бяха проведени изключително с мишки от порода СВА/J, която поради това се счита за предпочитаната порода (12) (13). Използват се млади възрастни мишки от женски пол, които не са раждали и не са бременни. В началото на изследването животните следва да бъдат на възраст между 8—12 седмици и отклоненията в теглото им следва да бъдат минимални и да не превишават 20 % от средното тегло. Алтернативно могат да бъдат използвани животни от други породи и от мъжки пол, когато има достатъчно събрани данни, които доказват, че не съществува реакция при LLNA: DA, която да показва съществени различия, обусловени от пола и/или породата.

Условия на отглеждане и хранене

8. Мишките следва да бъдат групово отглеждани (21), освен ако е направена подходяща научна обосновка за индивидуално отглеждане на мишките. Температурата в стаята на опитните животни следва да бъде 22 ± 3 °C. Въпреки че относителната влажност следва да бъде поне 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 следва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. За храненето могат да се използват обичайните лабораторни диети с неограничен достъп до вода за пиене.

Подготовка на животните

9. Животните се избират произволно, маркират се, за да е възможно индивидуалното им идентифициране (но не и чрез маркиране на ушите им) и се оставят в клетките си поне пет дни преди започване на дозирането, за да се аклиматизират към лабораторните условия. Преди да започне третирането, всички животни се изследват, за да се потвърди отсъствието на видими кожни лезии.

Приготвяне на разтворите за дозиране

10. Твърдите химикали следва да се разтворят или суспендират в разтворители/носител и ако е необходимо, да се разреждат преди прилагането им върху ушите на мишките. Течните химикали могат да се прилагат в чист или разреден вид преди дозирането. Неразтворимите химикали като тези, които обикновено се наблюдават в медицинските изделия, следва да се подложат на засилена екстракция в подходящ разтворител, за да се проявят всички екстрахируеми съставки за изпитване преди прилагането им върху ушите на мишките. Изпитваните вещества следва да се приготвят ежедневно, освен ако данните за устойчивостта им показват, че те могат да се съхраняват.

▼ M3

Проверка на надеждността

11. Положителните контролни химикали (ПК) се използват за доказване на подходящо провеждане на изпитването чрез реагиране с достатъчна и възпроизводима чувствителност на сенсibiliзиращо изпитвано вещество, за което степента на реакция е добре характеризирана. Препоръчва се включването на паралелна положителна контрола (ПК), защото така се доказва компетентността на лабораторията успешно да провежда всяко изследване и позволява оценка на вътрешно- и между-лабораторната възпроизводимост и сравнимост. Някои регулаторни органи също изискват ПК за всяко изпитване и поради това е препоръчително потребителите да се консултират със съответните органи преди провеждането на LLNA: DA. Следователно се насърчава рутинното използване на паралелна ПК, за да се избегне необходимостта от изследване на допълнителни животни за изпълняването на тези изисквания, които биха могли да възникнат в резултат на използването на периодична ПК (вж. точка 12). ПК следва да предизвика положителна LLNA: DA реакция при ниво на експозиция, при което се очаква нарастване на стимулационния индекс $SI \geq 1,8$ спрямо отрицателната контролна група (OK). Дозата за ПК следва да бъде избрана така, че да не причинява прекомерно кожно дразнене или системна токсичност и индукцията да е възпроизводима, но не прекомерна (например $SI > 10$ би се считало за прекомерно). Предпочитаните ПК са 25 % хексилканелен алдехид (№ 101-86-0 съгласно химичния регистър на Службата за химични индекси [CAS]) и 25 % евгенол (CAS номер 97-53-0) в ацетон: зехтин (4:1, об./об.). Може да има обстоятелства, при които след направено подходящо обосноваване могат да бъдат използвани други положителни контроли, отговарящи на горепосочените критерии.
12. При все че е препоръчително постоянното включване на паралелна положителна контролна (ПК) група, могат да съществуват ситуации, при които периодичното изпитване (т.е. на интервали ≤ 6 месеца) на ПК може да бъде подходящо за лаборатории, които редовно провеждат LLNA: DA (т.е. провеждат LLNA: DA с честота не по-малко от веднъж месечно) и имат създадена база данни от предишни изпитвания с ПК, доказваща способността на лабораторията да получава възпроизводими и точни резултати с положителните контроли. Подходяща компетентност за провеждане на LLNA: DA може да бъде успешно доказана чрез получаването на последователни положителни резултати с ПК при най-малко 10 независими изпитвания, проведени в рамките на разумен период от време (т.е. по-малко от една година).
13. Паралелна ПК група следва да се включва винаги, когато има процедурна промяна в LLNA: DA (например промяна на обученния персонал, промяна на материалите и/или реагентите, с които се провежда методът за изпитване, промяна на оборудването, с което се провежда методът за изпитване, промяна в произхода на опитните животни), като тези промени следва да бъдат документирани в лабораторни доклади. Следва да бъде обърнато внимание на въздействието на тези промени върху годността на предварително създадената база данни от предишни изпитвания с оглед да се определи необходимостта от създаване на нова база данни от предишни изпитвания за документиране на последователността на резултатите с ПК.
14. Изследователите следва да са наясно, че решението за периодично провеждане на изпитване с ПК вместо паралелното му провеждане има последици върху годността и приемливостта на отрицателните резултати от изпитването, получени без паралелна ПК по време на интервала между всяко периодично изпитване с ПК. Например, ако се получи фалшиво отрицателен резултат при периодичното изпитване с ПК, отрицателните резултати за изпитваното вещество, получени по време на интервала между последното приемливо периодично изпитване с ПК и неприемливото периодично изпитване с ПК, могат да бъдат поставени под съмнение. Изводите относно тези резултати следва внимателно да бъдат взети предвид при определяне дали да се включват паралелни ПК или само да се провеждат периодични ПК. Следва да се обърне внимание и на използването на по-малко животни в паралелната ПК група, когато това е научно обосновано и ако лабораторията докаже, въз основа на конкретните за лабораторията данни от предишни изпитвания, че могат да бъдат използвани по-малко мишки (22).

▼ M3

15. Въпреки че ПК следва да бъде изпитвана в носител, за който е известно, че при прилагането му се получава постоянна реакция (напр. ацетон: зехтин; 4:1, об./об.), може да има определени регулаторни ситуации, при които ще бъде необходимо провеждането на изпитване и в нестандартен носител (клинично/химично отговаряща формулация) (23). Ако паралелната ПК се изпитва в различен носител от изпитваното вещество, тогава следва да бъде включена отделна третирана с носителя контролна група за паралелната ПК.
16. В случаи, при които се оценяват вещества от определен химичен клас или спектър от реакции, еталонните вещества също могат да бъдат от полза, за да се докаже, че методът за изпитване функционира правилно по отношение на откриването на потенциала за кожна сенсibiliзация на тези видове вещества. Подходящите еталонни вещества следва да притежават следните свойства:
- структурно и функционално сходство с класа на изпитваното вещество;
 - известни физични/химични характеристики;
 - подкрепящи данни от LLNA: DA;
 - подкрепящи данни от други животински модели и/или от хора.

ПРОЦЕДУРА НА ИЗПИТВАНЕ

Брой на животните и нива на дозите

17. Използват се минимум четири животни за подложена на дадена доза група, при минимум три концентрации на изпитваното вещество, плюс паралелна отрицателна контролна група (ОК), третирана само с носителя на изпитваното вещество, както и ПК (паралелна или скорешна въз основа на лабораторната политика, като се вземат предвид точки 11—15). Следва да се обмисли изпитването на множество дози на ПК, особено когато не се провеждат редовни изпитвания на ПК. Животните от контролните групи следва да бъдат отглеждани и третирани по начин, идентичен с този, на животните от третираните групи, с изключение на това, че липсва третиране с изпитваното вещество.
18. Изборът на доза и носител следва да бъде основан на препоръките, посочени в библиографски бележки 2 и 24. Последователните дози обикновено се избират от подходяща поредица от концентрации като например 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % и т.н. Изборът на използваната поредица от концентрации следва да бъде придружен от подходяща научна обосновка. Цялата съществуваща токсикологична информация (напр. остра токсичност и кожно дразнене) и информацията за структурните и физикохимичните свойства на представляващото интерес изпитвано вещество (и/или структурно свързаните вещества) следва да бъде взета предвид в случай на наличност при избора на трите последователни концентрации, така че най-високата концентрация да увеличава в максимална степен експозицията, като същевременно се избягва системната токсичност и/или прекомерното локално кожно дразнене (24) (25). При липсата на такава информация може да е необходимо първоначално предварително скринингово изпитване (вж. точки 21—24).
19. Носителят не следва да пречи или да оказва влияние на резултата от изпитването и следва да бъде избран въз основа на способността си максимално да повишава разтворимостта, за да се получи най-високата постижима концентрация, като същевременно се приготвя подходящ разтвор/суспензия за прилагане на изпитваното вещество. Препоръчителните носители са ацетон: зехтин (4:1, об./об.), *N,N*-диметилформамид, метилетилкетон, пропилен гликол и диметилсулфоксид (6), но могат да бъдат използвани и други, при условие че се предостави достатъчна научна обосновка. При определени ситуации може да бъде необходимо да се използват клинично обусловени разтворители или търговска формулация, в която изпитваното вещество се маркира като допълнителна контрола. Особено внимание следва да бъде обърнато, за да се гарантира, че хидрофилните изпитвани вещества се инкорпорират в среда от носители, която навлажнява кожата и не се изпарява веднага чрез инкорпорирането на подходящи солубилизатори (напр. 1 % плуроник — Pluronic® L92). Поради тази причина носителите на изцяло водна основа трябва да бъдат избягвани.

▼ M3

20. Обработката на лимфни възли от отделни мишки дава възможност за оценка на вариабилността между животните и за статистическо сравнение на разликата между изпитваното вещество и измерванията в третиранията с носителя контролна група (вж. точка 33). В допълнение на това е възможно оценяване на възможността за намаляване на броя на мишките в ПК група, когато са събрани индивидуални данни за отделните животни (22). Освен това някои регулаторни органи изискват събирането на индивидуални данни за отделните животни. Редовното събиране на индивидуални данни за отделните животни предоставя предимство по отношение на хуманното отношение към животните, като се избягва дублирането на изпитвания, което би било необходимо, ако резултатите за изпитваното вещество, които първоначално са събрани по един начин (напр. чрез сборни данни за животните), по-късно бъдат разглеждани от регулаторни органи с други изисквания (напр. за събиране на индивидуални данни за отделните животни).

Предварителното скринингово изпитване

21. При липсата на информация за определянето на най-високата доза за изпитване (вж. точка 18) следва да се извърши предварително скринингово изпитване, за да се определи подходящото ниво на дозата за изпитване при LLNA: DA. Целта на предварителното скринингово изпитване е да предостави насоки за избора на максималното ниво на дозата, което да бъде използвано в основното изпитване LLNA: DA, в случаите, когато не е налична информация за концентрацията, която причинява системна токсичност (вж. точка 24) и/или прекомерно локално кожно дразнене (вж. точка 23). Изпитваното максимално ниво на дозата следва да бъде 100 % от изпитваното вещество за течности или максималната възможна концентрация за твърди вещества или суспензии.
22. Предварителното скринингово изпитване се провежда при условия, идентични на тези в основното изпитване LLNA: DA, с изключение на това, че не се оценява пролиферацията на лимфните възли и могат да бъдат използвани по-малко животни за подложена на дадена доза група. Предлага се използването на едно или две животни за подложена на дадена доза група. Всички мишки се наблюдават ежедневно за всякакви клинични признаци за системна токсичност или локално дразнене на мястото на прилагане. Телесните тегла се записват преди изпитването и преди завършването му (ден 8). И двете уши на всяка мишка се наблюдават за еритема и резултатите се отчитат, като се използва таблица 1 (25). Измерванията на дебелината на ушите се правят, като се използва измервателен уред за дебелината (напр. цифров микрометър или измервателен уред за дебелина Peacock Dial) в ден 1 (преди дозирането), ден 3 (приблизително 48 часа след първата доза), ден 7 (24 часа преди приключването) и ден 8. Освен това дебелината на ушите в ден 8 би могла да бъде определена чрез продупчване на ушите и определяне на теглото на взетите продупчени части, което следва да се извърши след като животните бъдат умъртвени по хуманен начин. Показател за прекомерно локално дразнене е балова оценка на еритемата ≥ 3 и/или дебелина на ушите в размер на $\geq 25\%$ в който и било от дните с измервания (26) (27). Най-високата доза, избрана за основното изпитване LLNA: DA, ще бъде следващата по-ниска доза от поредицата от концентрации в предварителното скринингово изпитване (вж. точка 18), която не причинява системна токсичност и/или прекомерно локално кожно дразнене.

Таблица 1

Оценки на еритемата

Наблюдение	Балова оценка
Отсъствие на еритема	0
Много слаба еритема (едва забележима)	1
Добре изразена еритема	2

▼ M3

Наблюдение	Балова оценка
Умерена до тежка еритема	3
Тежка еритема (силно зачервяване — с цвят на цвекло) до образуване на есхара, което не позволява да се отчете баловата оценка на еритемата	4

23. В допълнение към увеличаване на дебелината на ушите с 25 % (26) (27), за идентифициране на дразнители при LLNA също така се използва статистически значимо увеличаване на дебелината на ушите при третираните мишки в сравнение с контролните мишки (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Въпреки това, макар че могат да възникнат статистически значими увеличения, когато дебелината на ушите е по-малка от 25 %, те не са конкретно свързани с прекомерното дразнене (30) (31) (32) (33) (34).
24. Следните клинични наблюдения могат да показват системна токсичност (35), когато се използват като част от интегрална оценка, и поради това могат да показват максималното ниво на дозата, което да се използва в основното LLNA: DA: промени във функционирането на нервната система (напр. пилоерекция, атаксия, тремори и конвулсии); промени в поведението (напр. агресивност, промяна в хигиената на тялото, изразена промяна в нивото на активност); промени в начина на дишане (т.е. промени в честотата и интензивността на дишането като диспнея, задъханост и хрипове) и промени в консумацията на храна и вода. Освен това в оценката следва да бъдат взети предвид признаци на летаргия и/или липса на реакция и всякакви клинични признаци на нещо повече от лека или моментна болка и страдание или намаляване на телесното тегло > 5 % от ден 1 до ден 8, както и смъртността. Умиращите животни, както и животните, които показват признаци на силна болка или страдание, следва да бъдат умъртвени по хуманен начин (36).

Експериментален график на основното изпитване

25. Експерименталният график на изпитването е, както следва:

- *Ден 1:* индивидуално се идентифицира и записва теглото на всяко животно и всяко клинично наблюдение. Прилага се 1 % воден разтвор на натриев лаурил сулфат (SLS) в горната част на всяко ухо, като се използва четка, потопена в разтвора на SLS, за да се покрие цялата горна част на всяко ухо с четири-пет движения. Един час след третирането със SLS се прилага се 25 µl подходящо разреден разтвор на изпитваното вещество, както и самостоятелно носителят или положителната контрола (паралелна или скорощна въз основа на лабораторната политика, като се вземат предвид точки 11—15), в горната част на всяко ухо.
- *Дни 2, 3 и 7:* повтаря се процедурата по предварително третиране и прилагане на изпитваното вещество с 1 % воден разтвор на SLS, извършена в ден 1.
- *Дни 4, 5, и 6:* няма третиране.
- *Ден 8:* записва се теглото на всяко животно и всяко клинично наблюдение. Приблизително 24—30 часа след началото на прилагането в ден 7, животните се умъртвяват по хуманен начин. Дренажните аурикуларни (ушни) лимфни възли от всяко ухо на мишката се отрязват и обработват отделно в буферен физиологичен разтвор с фосфат (PBS) за всяко животно. Подробности и диаграми за идентифицирането и дисекцията на лимфните възлите могат да бъдат намерени в позоваване (22). За допълнително наблюдение на локалната кожна реакция при основното изпитване в протокола от изпитването могат да бъдат включени допълнителни параметри като оценяване на ушната еритема или измервания на дебелината на ушите (получени или чрез използването на измервателен уред за дебелината, или чрез продупчване на ушите и определяне на теглото на взетите продупчени части при аутопсията).

▼ M3

Приготвяне на клетъчни суспензии

26. От всяка мишка се приготвя клетъчна суспензия от единични клетки, която се приготвя от клетки от лимфни възли (КЛВ), отрязани двустранно чрез поставяне на лимфните възли между две предметни стъкла и упражняване на лек натиск за раздробяване на възлите. След потвърждаване, че тъканта се е разстала тънко, двете предметни стъкла се разделят. Тъканта се суспендира на двете предметни стъкла в PBS чрез задържане на всяко стъкло на ъгъла на лабораторната чаша и промиване с PBS, като едновременно с това тъканта се остъргва от стъклото с прибор за остъргване на клетки. Освен това лимфните възли на животните в отрицателната контролна група са малки, поради което е важно да се действа внимателно, за да избегнат каквито и да било изкуствени ефекти върху стойностите на SI. Следва да бъде използван общ обем от 1 mL PBS за промиване на двете предметни стъкла. Суспензията, приготвена от КЛВ в лабораторна чаша, следва да бъде хомогенизирана леко с прибор за остъргване на клетки. След това с микропипета се събира аликвотна част от 20 µL от суспензията, приготвена от КЛВ, като се внимава да не се отнеме от мембраната, която е видима с просто око, и впоследствие се смесва с 1,98 mL PBS за създаване на проба с обем 2 mL. След това се приготвя втора проба с обем 2 mL, като се използва същата процедура, така че да бъдат приготвени две проби за всяко животно.

Определяне на клетъчната пролиферация (измерване на съдържанието на аденозинтрифосфат (АТФ) в лимфоцитите)

27. Увеличенията в съдържанието на АТФ в лимфните възли се измерват чрез метода луциферин/луцифераза, като се използва комплект за измерване на АТФ, с който се измерва биолуминесценцията в относителни единици луминесценция (RLU). Времетраенето на изпитването от момента на умъртвяване на животното до измерване на съдържанието на АТФ за всяко отделно животно следва да е еднакво, в рамките на приблизително 30 минути, тъй като се счита, че съдържанието на АТФ постепенно намалява с времето след умъртвяване на животното (12). Поради това сериите от процедури от отрязването на аурикуларните (ушни) лимфни възли до измерването на АТФ следва да бъдат завършени в рамките на 20 минути съгласно предварително определените времеви график, който е един и същ за всяко животно. Луминесценцията на АТФ следва да бъде измерена във всяка проба с обем 2 mL, така че да бъдат събрани общо две измервания на АТФ за всяко животно. След това се определя средната луминесценция на АТФ и тя се използва в последващи изчисления (вж. точка 30).

НАБЛЮДЕНИЯ**Клинични наблюдения**

28. Всяка мишка следва да бъде внимателно наблюдавана поне веднъж дневно за всякакви клинични признаци за локално дразнене на мястото на прилагане или за системна токсичност. Всички наблюдения систематично се записват, като се водят дневници за всяка мишка. Плановете за наблюдение следва да включват критерии за бързото идентифициране на мишките, които показват признаци на системна токсичност, прекомерно локално кожно дразнене или корозивност на кожата, за да бъдат подложени на евтаназия (36).

Телесни тегла

29. Както е посочено в точка 25, индивидуалните телесни тегла на животните следва да бъдат измерени в началото на изпитването и при планираното им умъртвяване по хуманен начин.

ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

30. Резултатите за всяка третирана група се изразяват като средния SI. SI се получава чрез разделяне на средната стойност на RLU/мишка във всяка група, изследвана с изпитваното вещество, и в положителната контролна група, на средната стойност на RLU/мишка за контролната група, третирана с разтворителя/носителя. Средната стойност на SI за контролите, третирани с носителя, е единица.

▼ M3

31. При процеса на вземане на решение даден резултат се счита за положителен, когато $SI \geq 1,8$ (10). Силата на зависимостта доза—отговор, статистическата значимост и постоянството на разтворителя/носителя и ПК реакциите обаче също могат да бъдат използвани при определянето дали даден граничен резултат (т.е. стойност на SI между 1,8 и 2,5) да бъде обявен за положителен (2) (3) (37).
32. При гранична положителна реакция със стойност на SI между 1,8 и 2,5 ползвателите могат да вземат предвид допълнителна информация като например зависимостта доза—отговор, доказателство за системна токсичност или прекомерно дразнене и, където е подходящо, статистическата значимост заедно със стойностите на SI, с цел потвърждаване, че тези резултати са положителни (10). Следва да бъде обърнато внимание на различните свойства на изпитваното вещество, включително дали то има структурна връзка с познати кожни сенсibiliзатори, дали причинява прекомерно кожно дразнене при мишките, както и какво е естеството на наблюдаваната зависимост доза—отговор. Тези и други съображения подробно се обсъждат на друго място (41).
33. Събирането на данни на нивото на отделните мишки ще даде възможност за статистически анализ на наличието и степента на зависимостта доза—отговор в данните. Всяка статистическа оценка би могла да включва оценка на зависимостта доза—отговор, както и подходящо направени сравнения между изпитваните групи (напр. сравнения по двойки на дозираните групи с паралелната третирана с разтворителя/носителя контролна група). Статистическите анализи могат да включват например линейна регресия или изпитването на William за оценка на тенденциите в зависимостта доза—отговор и изпитването на Dunnett за сравнения по двойки. При избора на подходящ метод за статистически анализ, изследователят следва да обърне внимание на възможни различия в дисперсиите и други свързани с тях проблеми, които могат да наложат трансформация на данните или провеждане на непараметричен статистически анализ. Във всеки случай на изследователя може да му се наложи да извърши изчисления за SI и статистически анализи със и без определени точки с данни (понякога наричани „отклоняващи се стойности“).

ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

Данни

34. Данните следва да бъдат обобщени в табличен вид, като се посочват индивидуалните RLU стойности за отделните животни, средната стойност RLU/животно за групата, свързаните с тях граници на отклонение (напр. SD, SEM) и средният SI за всяка подложена на дадена доза група, сравнени с паралелната третирана с разтворителя/носителя контролна група.

Протокол от изпитването

35. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитвани и контролни химикали:

- идентификационни данни (напр. CAS и EC номера, ако са налични; източник, чистота, известни примеси, номер на партидата);
- физична форма и физикохимични свойства (напр. летливост, устойчивост, разтворимост);
- ако е смес, състав и относително съотношение в проценти на елементите.

Разтворител/носител:

- идентификационни данни (чистота; концентрация, където е подходящо; използвано количество);
- обосновка за избора на носител.

▼ M3*Опитни животни:*

- произход на мишките от порода СВА;
- микробиологичен статус на животните, ако е известен;
- брой и възраст на животните;
- произход на животните, условия на отглеждане, диета и т.н.

Условия на изпитване:

- източник, номер на партидата и данни, свързани с осигуряването на качеството/контрола на качеството на производителя за комплекта за АТР;
- подробна информация за приготвянето и прилагането на изпитваното вещество;
- обосновка за избора на доза (включително резултатите от предварителното скринингово изпитване, ако е проведено);
- използвани концентрации на изпитваното вещество и носителя и общо количество на приложеното изпитвано вещество;
- подробна информация за качеството на храната и водата (включително вид/източник на диетата, водоизточник);
- подробна информация за графици на третиране и вземане на проби;
- методи за измерване на токсичността;
- критерии за считане на изпитванията за положителни или отрицателни;
- подробна информация за всякакви отклонения от протокола и обяснение как отклонението влияе на планирането на изпитването и на резултатите от него.

Проверка на надеждността:

- обобщение на резултатите от последната проверка на надеждността, включително информация за използваните изпитвано вещество, концентрация и носител;
- данни за паралелни и/или предишни положителни контроли и паралелни отрицателни контроли (разтворител/носител) за лабораторията, провеждаща изпитването;
- ако не е била включена паралелна положителна контрола, се посочва датата и лабораторният доклад на най-скорошното периодично изпитване с положителна контрола и доклад, в който подробно се представят данните от предишни изпитвания с положителни контроли на лабораторията и който обосновава защо не се провежда паралелна положителна контрола.

Резултати:

- индивидуални тегла на мишките в началото на дозирането и при планираното им умъртвяване; както и средният и граница на отклонение (напр. SD, SEM) за всяка третирана група;
- признаци на токсичност и време на настъпването им, включително кожно дразнене на мястото на прилагане, ако има такова, за всяко животно;
- време на умъртвяване на животно и време на измерване на АТР за всяко животно;
- таблица на RLU стойностите и стойностите на SI за отделните мишки за всяка третирана с доза група;
- средната стойност и съответна граница на отклонение (напр. SD, SEM) за RLU/мишка за всяка третирана група и резултатите от анализа на отклоняващите се стойности за всяка третирана група;

▼ **M3**

- изчисленият SI и подходяща мярка за варибилността, която отчита варибилността между животните както в групата с изпитваното вещество, така и в контролната група;
- зависимостта доза—отговор;
- статистически анализи, където е подходящо;

Обсъждане на резултатите:

- кратък коментар на резултатите, анализ на зависимостта доза—отговор и статистически анализ, където е подходящо, със заключение дали изпитваното вещество следва да се счита за кожен сенсibiliзатор.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline № 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 985-997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. На разположение на адрес: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.
- (8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 274-286.
- (9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication № 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. На разположение на адрес: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm>]

▼ M3

- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. На разположение на адрес: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRpt2009.pdf].
- (12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.
- (13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.
- (14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline № 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreesen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81-88.
- (18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127-132.
- (19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.
- (20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.
- (21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. На разположение на адрес: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]
- (23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline № 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

▼ M3

- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. На разположение на адрес: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>]
- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. На разположение на адрес: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acute/tox_workshop.htm]
- (36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.
- (38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 34, ENV/JM/MONO_(2005)14, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

▼ M3

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: степента на близост на съвпадение на резултатите от метода за изпитване и приетите референтни стойности. Това е мярка за ефективността на метода за изпитване и един от аспектите на неговата приложимост. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съвпадение“, за да се обозначи делът на верните резултати на даден метод за изпитване (38).

Еталонно вещество: вещество, което предизвиква или не предизвиква сенсibiliзация, използвано като норма за сравнение с изпитваното вещество. Едно еталонно вещество следва да притежава следните свойства: i) постоянен и надежден източник; ii) структурно и функционално сходство с класа на изпитваните вещества; iii) известни физикохимични характеристики; iv) потвърждаващи данни за известни въздействия; и v) известна ефективност за постигане на желаната реакция.

Вещество с фалшиво отрицателен резултат: изпитвано вещество, неправилно определено като даващо отрицателен резултат или неактивно при даден метод за изпитване, докато в действителност то дава положителен резултат или е активно.

Вещество с фалшиво положителен резултат: изпитвано вещество, неправилно определено като даващо положителен резултат или активно от дадено изпитване, докато в действителност то дава отрицателен резултат или е неактивно.

Опасност: потенциалът за получаване на неблагоприятен за здравето или екологичен ефект. Неблагоприятният ефект се проявява само при достатъчно голяма степен на експозиция.

Междулабораторна възпроизводимост: мярка за степента, в която различните квалифицирани лаборатории, които използват един и същи протокол и изпитват едни и същи изпитвани вещества, могат да получат качествено и количествено сходни резултати. Междулабораторната възпроизводимост се определя по време на процесите на предварително валидиране и на валидиране и показва степента, в която изпитването може да бъде трансферирано успешно между лабораториите, също наричана възпроизводимост между лабораториите (38).

Вътрешнолабораторна възпроизводимост: определяне на степента, в която квалифицирани служители в рамките на една и съща лаборатория могат да възпроизведат успешно резултатите, като използват конкретен протокол в различни моменти. Също наричана възпроизводимост в рамките на лабораторията (38).

Отклоняваща се стойност: отклоняващата се стойност е наблюдение, което е маркирано като различно от други стойности в произволно избрана извадка от популация.

Осигуряване на качеството: управленски процес, при който спазването на лабораторни стандарти за изпитване, изисквания и процедури за водене на дневници, както и точността на трансфера на данни, се оценява от лица, които са независими от лицата, изпълняващи изпитването.

Надеждност: мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да се извърши възпроизводимо в една и съща лаборатория и между различни лаборатории в течение на времето, когато се използва един и същи протокол. Надеждността се оценява, като се изчислява вътрешно- и междулабораторната възпроизводимост (38).

Кожна сенсibiliзация: имунологичен процес, който възниква, когато податлив индивид е локално изложен на химичен алерген с предизвикващо действие, който предизвиква кожна имунна реакция, водеща до развиването на контактна сенсibiliзация.

Стимуляционен индекс (SI): стойност, изчислявана за оценка на потенциала на дадено изпитвано вещество да предизвиква кожна сенсibiliзация, която представлява съотношението на пролиферацията в третирани групи спрямо тази в паралелната третирана с носителя контролна група.

Изпитвано вещество (също наричано изпитван химикал): всяко вещество или смес, изпитвано(а) чрез използването на настоящия метод за изпитване.

▼ M3

**Б.51. КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: ИЗСЛЕДВАНЕ НА
ЛОКАЛНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ: BRDU-ELISA****ВЪВЕДЕНИЕ**

1. Указанията за изпитването на химикали на ОИСП и методите за изпитване на ЕС периодично се преразглеждат с оглед на научния прогрес, промяната на регулаторните нужди и съображенията, свързани с хуманното отношение към животните. Първият метод за изпитване (МИ) (Б.42) за определянето на кожна сенсibiliзация при мишки — Изследването на локалните лимфни възли (LLNA, Указание за изпитване 429 на ОИСП) — беше преработен (1 и глава Б.42 от настоящото приложение). Публикувана е подробна информация за валидирането на LLNA и е направен преглед на съответните научни трудове (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). При изследването LLNA се използва радиоизотопен тимидин или йод за измерване на пролиферацията на лимфоцитите и поради това изследването има ограничена употреба, когато придобиването, използването или обезвреждането на радиоактивни вещества е проблематично. LLNA: BrdU-ELISA [Ензимно свързан имуносорбентен анализ ELISA] е нерадиоактивно изменение на МИ LLNA, при което се използва 5-бромо-2-деоксиуридин (BrdU) (№ 59-14-3 съгласно химичния регистър на Службата за химични индекси [CAS]), който не е радиомаркиран, в базирана на ELISA система за изпитване с цел измерване на пролиферацията на лимфоцитите. LLNA: BrdU-ELISA е валидиран, преработен и препоръчан от независима научна международна група за партньорска оценка, тъй като се счита за полезен за идентифициране на химикалите, които са кожни сенсibiliзатори, както и на химикалите, които не предизвикват кожна сенсibiliзация, с известни ограничения (10) (11) (12). Този МИ е предназначен за оценка на потенциала на химикалите (вещества и смеси) да предизвикват кожна сенсibiliзация при животни. Глава Б.6 от настоящото приложение и Указание за изпитване 406 на ОИСП използват изследвания върху морски свинчета, по-специално максимизиращ тест върху морски свинчета и тест на Buehler (13). LLNA (глава Б.42 от настоящото приложение; Указание за изпитване 429 на ОИСП) и двете му нерадиоактивни изменения: LLNA: BrdU-ELISA (глава Б.51 от настоящото приложение; Указание за изпитване 442 Б на ОИСП) и LLNA: DA (глава Б.50 от настоящото приложение; Указание за изпитване 442 А на ОИСП) — всички те предоставят предимство спрямо изследванията върху морски свинчета в Б.6 и Указание за изпитване 406 на ОИСП (13), що се отнася до намаляването и усъвършенстването на използването на животни.
2. Подобно на LLNA, методът LLNA: BrdU-ELISA проучва индукционната фаза при кожна сенсibiliзация и осигурява количествени данни, подходящи за оценяване на зависимостта доза—отговор. Освен това способността за откриване на кожни сенсibiliзатори без да е необходимо използването на радиомаркер за ДНК елиминира потенциалната възможност за професионална експозиция на радиоактивност, както и проблемите, свързани с обезвреждането на отпадъци. Това от своя страна може да даде възможност за повишаване на използването на мишки за откриване на кожни сенсibiliзатори, което още повече би могло да намали използването на морски свинчета за изпитване на потенциала за кожна сенсibiliзация (т.е. Б.6; Указание за изпитване 406 на ОИСП) (13).

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

3. Използваните определения са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

4. LLNA: BrdU-ELISA е модифициран метод LLNA за определяне на химикалите, които са потенциални кожни сенсibiliзатори, с известни ограничения. Това не означава непременно, че при всички случаи следва да се използва LLNA: BrdU-ELISA вместо LLNA или изследванията върху морски свинчета (т.е. глава Б.6, Указание за изпитване 406 на ОИСП) (13), а по-скоро че изпитването е равносложно и може да бъде използвано като алтернатива, при която обикновено положителните и отрицателните резултати вече не изискват допълнително потвърждаване (10) (11). Лабораторията, провеждаща изпитването, следва да вземе предвид цялата налична информация за

▼ M3

изпитваното вещество преди провеждането на изпитването. Тази информация ще включва идентичността и химичната структура на изпитваното вещество; неговите физикохимични свойства; резултатите от всякакви други *in vitro* или *in vivo* токсикологични изпитвания на изпитваното вещество; и токсикологични данни за структурно свързани вещества. Тази информация следва да се вземе предвид, за да се определи дали LLNA: BrdU-ELISA е подходящо за изпитваното вещество (с оглед на несъвместимостта на ограничен брой видове химикали с LLNA: BrdU-ELISA [вж. точка 5]) и като помощно средство при избора на доза.

5. LLNA: BrdU-ELISA е *in vivo* метод и вследствие на това няма да доведе до преустановяване на използването на животни при оценяването на алергичната контактна сенсibiliзираща активност. Той обаче има потенциала да намали използването на животни за тази цел в сравнение с изследванията върху морски свинчета (Б.6; Указание за изпитване 406 на ОИСП) (13). Освен това LLNA: BrdU-ELISA предлага съществено усъвършенстване на начина, по който животните се използват за изпитване на алергичната контактна сенсibiliзация, тъй като за разлика от глава Б.6 и Указание за изпитване 406 на ОИСП, LLNA: BrdU-ELISA не изисква да се разкрие кожна свръхчувствителност след предизвикване. Освен това LLNA: BrdU-ELISA не изисква употребата на адювант, както в случаите на максимизиращ тест върху морски свинчета (глава Б.6 от настоящото приложение, 13). По такъв начин LLNA: BrdU-ELISA намалява страданието на животните. Въпреки предимствата на LLNA: BrdU-ELISA пред Б.6 и Указание за изпитване 406 на ОИСП (13), съществуват определени ограничения, които могат да доведат до необходимост от използване на Б.6 или на Указание за изпитване 406 на ОИСП (напр. изпитването на определени метали, погрешно положителни резултати при определени кожни дразнителни) [например някои видове повърхностно-активни вещества] (6) (1 и глава Б.42 от настоящото приложение) или разтворимостта на изпитваното вещество). Освен това химичните класове или вещества, съдържащи функционални групи, за които е доказано, че водят до възможно объркване (15), могат да доведат до необходимост от използване на изследванията върху морски свинчета (т.е. Б.6; Указание за изпитване 406 на ОИСП (13). Установените за LLNA ограничения (1 и глава Б.42 от настоящото приложение) се препоръчва да бъдат прилагани и по отношение на LLNA: BrdU-ELISA (10). С изключение на тези установени ограничения, LLNA: BrdU-ELISA следва да се прилага за изпитване на всички химикали, освен ако съществуват свързани с тези химикали свойства, които могат да повлияят на точността на LLNA: BrdU-ELISA. Освен това следва да бъде обърнато внимание на възможността за гранични положителни резултати, когато са получени стойности на стимулационния индекс (SI) между 1,6 и 1,9 (вж. точки 31—32). Това се основава на базата данни от валидирането, състояща се от 43 вещества, използващи SI $\geq 1,6$ (вж. точка 6), за които изследването LLNA: BrdU-ELISA правилно е определило всички 32 сенсibiliзатора при LLNA, но неправилно е определило две от 11-те вещества, които не са сенсibiliзатори при LLNA със стойности на SI между 1,6 и 1,9 (т.е. гранично положителни) (10). При все това, тъй като същият набор от данни беше използван за определяне на стойностите на SI и изчисляване на прогнозните способности на изпитването, посочените резултати могат да представляват надценяване на реалните прогнозни способности.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

6. Основният принцип, залегнал в LLNA: BrdU-ELISA, е, че сенсibiliзаторите предизвикват пролиферация на лимфоцитите в лимфните възли, дренажни мястото на прилагане на изпитваното вещество. Тази пролиферация е пропорционална на дозата и на действието на приложени алерген и осигурява лесен начин за получаване на количествено измерване на сенсibiliзацията. Пролиферацията се измерва чрез сравняване на средната пролиферация във всяка изпитвана група със средната пролиферация в третираната с носителя контролна група (КН). Съотношението на средната пролиферация във всяка третирана група спрямо тази в паралелната третирана с носителя контролна група, наречено SI, е определено и следва да бъде $\geq 1,6$, преди да се гарантира по-нататъшната оценка на тест-субстанцията като потенциален кожен сенсibiliзатор. Описаните тук процедури се основават на измерването на съдържанието на BrdU за показване на

▼ M3

увеличения брой на пролифериращите клетки в дрениращите аурiculoарни (ушни) лимфни възли. BrdU е аналогичен на тимидина и по подобен начин е инкорпориран в ДНК-то на пролифериращите клетки. Инкорпорирането на BrdU се измерва чрез ELISA, при който се използва специфично за BrdU антитяло, което също е маркирано с пероксидаза. Когато се добави субстратът, пероксидазата реагира със субстрата и произвежда цветен продукт, който количествено се определя при специфична абсорбция, като се използва ридер за микротитърна плака.

ОПИСАНИЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**Избор на животински вид**

7. Видът животни, избран за това изследване, е мишка. Изследванията за валидиране на LLNA: BrdU-ELISA бяха проведени изключително с мишки от порода CBA/JN, която поради това се счита за предпочитаната порода (10) (12). Използват се млади възрастни мишки от женски пол, които не са раждали и не са бременни. В началото на изследването животните следва да бъдат на възраст 8—12 седмици и отклоненията в теглото им следва да бъдат минимални и да не превишават 20 % от средното тегло. Алтернативно могат да бъдат използвани животни от други породи и от мъжки пол, когато има достатъчно събрани данни, които доказват, че не съществува реакция при LLNA: BrdU-ELISA, която да показва съществени различия, обусловени от пола и/или породата.

Условия на отглеждане и хранене

8. Мишките следва да бъдат групово отглеждани (16), освен ако е предоставена подходяща научна обосновка за индивидуално отглеждане на мишките. Температурата в стаята на опитните животни следва да бъде 22 ± 3 °C. Въпреки че относителната влажност следва да бъде поне 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 следва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. За храненето могат да се използват обичайните лабораторни диети с неограничен достъп до вода за пиене.

Подготовка на животните

9. Животните се избират произволно, маркират се, за да е възможно индивидуалното им идентифициране (но не и чрез маркиране на ушите им) и се оставят в клетките си поне пет дни преди започване на дозирането, за да се аклиматизират към лабораторните условия. Преди да започне третирането, всички животни се изследват, за да се потвърди отсъствието на видими кожни лезии.

Приготвяне на разтворите за дозиране

10. Твърдите химикали следва да се разтворят или суспендират в разтворители/носители и, ако е необходимо, да се разреждат преди прилагането им върху ушите на мишките. Течните химикали могат да се прилагат в чист или разреден вид преди дозирането. Неразтворимите химикали като тези, които обикновено се наблюдават в медицинските изделия, следва да се подложат на засилена екстракция в подходящ разтворител, за да се проявят всички екстрахируеми съставки за изпитване преди прилагането им върху ушите на мишките. Изпитваните вещества следва да се приготвят ежедневно, освен ако данните за устойчивостта им показват, че те могат да се съхраняват.

Проверка на надеждността

11. Положителните контролни химикали (ПК) се използват за доказване на подходящо провеждане на изпитването чрез реагиране с достатъчна и възпроизводима чувствителност като сенсibiliзиращо изпитвано вещество, за което степента на реакция е добре характеризирана. Препоръчва се включването на паралелна положителна контрола (ПК), защото тя доказва компетентността на лабораторията успешно да провежда всяко изследване и позволява оценка на вътрешно- и междулабораторната възпроизводимост и сравнимост. Някои регулаторни органи също изискват ПК за всяко изпитване и поради това е препоръчително потребителите да се консултират със съответните органи преди провеждането на LLNA: BrdU-ELISA. В съответствие с това се насърчава рутинното използване на паралелна положителна

▼ M3

контрола, за да се избегне необходимостта от изследване на допълнителни животни за изпълняването на тези изисквания, които биха могли да възникнат в резултат на използването на периодична положителна контрола (вж. точка 12). ПК следва да предизвика положителна LLNA: BrdU-ELISA реакция при ниво на експозиция, при което се очаква нарастване на стимулационния индекс $SI \geq 1,6$ спрямо отрицателната контролна група (ОК). Дозата за ПК следва да бъде избрана така, че да не причинява прекомерно кожно дразнене или системна токсичност и индукцията да е възпроизводима, но не прекомерна (например $SI > 14$ би се считало за прекомерно). Предпочитаните ПК са 25 % хексилканелен алдехид (CAS № 101-86-0) и 25 % евгенол (CAS № 97-53-0) в ацетон: зехтин (4:1, об./об.). Може да има обстоятелства, при които след направено подходящо обосноваване, могат да бъдат използвани други положителни контроли, отговарящи на горепосочените критерии.

12. При все че е препоръчително постоянното включване на паралелна положителна контролна (ПК) група, могат да съществуват ситуации, при които периодичното изпитване (т.е. на интервали ≤ 6 месеца) на ПК може да бъде подходящо за лаборатории, които редовно провеждат LLNA: BrdU-ELISA (т.е. провеждат LLNA: BrdU-ELISA с честота не по-малко от веднъж месечно) и които имат създадена база данни от предишни изпитвания с ПК, доказваща способността на лабораторията да получава възпроизводими и точни резултати с положителните контроли. Подходяща компетентност за провеждане на LLNA: BrdU-ELISA може да бъде успешно доказана чрез получаването на последователни положителни резултати с ПК при най-малко 10 независими изпитвания, проведени в рамките на разумен период от време (т.е. по-малко от една година).
13. Винаги следва да се включва паралелна ПК група, когато има процедурна промяна в LLNA: BrdU-ELISA (например промяна на обученения персонал, промяна на материалите и/или реагентите, с които се провежда методът за изпитване, промяна на оборудването, с което се провежда методът за изпитване, промяна в произхода на опитните животни), като тези промени следва да бъдат документирани в лабораторни доклади. Следва да бъде обърнато внимание на въздействието на тези промени върху годността на предварително създадената база данни от предишни изпитвания с оглед да се определи необходимостта от създаване на нова база данни от предишни изпитвания за документирани на последователността на резултатите с ПК.
14. Изследователите следва да са наясно, че решението за периодично провеждане на изпитване с положителна контрола вместо паралелното му провеждане има последици върху годността и приемливостта на отрицателните резултати от изпитването, получени без паралелна положителна контрола по време на интервала между всяко периодично изпитване с положителна контрола. Например, ако се получи фалшиво отрицателен резултат при периодичното изпитване с положителна контрола, отрицателните резултати за изпитваното вещество, получени по време на интервала между последното приемливо периодично изпитване с положителна контрола и неприемливото периодично изпитване с положителна контрола, могат да бъдат поставени под съмнение. Изводите относно тези резултати следва да бъдат внимателно взети предвид при определяне дали да се включват паралелни ПК или само да се провеждат периодични ПК. Следва да се обърне внимание и на използването на по-малко животни в паралелната ПК група, когато това е научно обосновано и ако лабораторията докаже, въз основа на конкретните за лабораторията данни от предишни изпитвания, че могат да бъдат използвани по-малко мишки (17).
15. Въпреки че положителната контрола следва да бъде изпитвана в носителя, за който е известно, че при прилагането му се получава постоянна реакция (напр. ацетон: зехтин; 4:1, об./об.), може да има определени регулаторни ситуации, при които също така ще бъде необходимо провеждането на изпитване в нестандартен носител (клинично/химично отговаряща формулация) (18). Ако паралелната положителна контрола се изпитва в различен носител от изпитваното вещество, тогава следва да бъде включена отделна третирана с носителя контролна група за паралелната положителна контрола.

▼ M3

16. В случаи, при които се оценяват изпитвани вещества от определен химичен клас или спектър от реакции, еталонните вещества също могат да бъдат от полза, за да се докаже, че методът за изпитване функционира правилно по отношение на откриването на потенциала за кожна сенсibiliзация на тези видове изпитвани вещества. Подходящите еталонни вещества следва да притежават следните свойства:

- структурно и функционално сходство с класа на изпитваното вещество;
- известни физични/химични характеристики;
- подкрепящи данни от LLNA: BrdU-ELISA;
- подкрепящи данни от други животински модели и/или от хора.

ПРОЦЕДУРА НА ИЗПИТВАНЕ

Брой на животните и нива на дозите

17. Използват се минимум четири животни за подложена на дадена доза група, при минимум три концентрации на изпитваното вещество, плюс паралелна отрицателна контролна група (ОК), третирана само с носителя на изпитваното вещество, както и ПК група (паралелна или скорошна въз основа на лабораторната политика, като се вземат предвид точки 11—15). Следва да се обмисли изпитването на множество дози на положителната контрола, особено когато не се провеждат редовни изпитвания на ПК. Животните от контролните групи следва да бъдат отглеждани и третирани по начин, идентичен с този, на животните от третираните групи, с изключение на това, че липсва третиране с изпитваното вещество.

18. Изборът на доза и носител следва да бъде основан на препоръките, посочени в библиографски бележки 2 и 19. Последователните дози обикновено се избират от подходяща поредица от концентрации като например 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % и т.н. Изборът на използваната поредица от концентрации следва да бъде придружен от подходяща научна обосновка. Цялата съществуваща токсикологична информация (напр. остра токсичност и кожно дразнене) и информацията за структурните и физикохимичните свойства на представляващото интерес изпитвано вещество (и/или структурно свързаните вещества) следва да бъде взета предвид в случай на наличност при избора на трите последователни концентрации, така че най-високата концентрация да увеличава в максимална степен експозицията, като същевременно се избягва системната токсичност и/или прекомерното локално кожно дразнене (19) (20) и глава Б.4 от настоящото приложение). При липсата на такава информация може да е необходимо първоначално предварително скринингово изпитване (вж. точки 21—24).

19. Носителят не следва да пречи или да оказва влияние на резултата от изпитването и следва да бъде избран въз основа на способността му максимално да повишава разтворимостта, за да се получи най-високата постижима концентрация, като същевременно се приготвя подходящ разтвор/суспензия за прилагане на изпитваното вещество. Препоръчителните носители са ацетон: зехтин (4:1, об./об.), *N,N*-диметилформамид, метилетилкетон, пропилен гликол и диметилсулфоксид (6), но могат да бъдат използвани и други, при условие че се предостави достатъчна научна обосновка. При определени ситуации може да бъде необходимо да се използват клинично обусловени разтворители или търговска формулация, в която изпитваното вещество се маркира като допълнителна контрола. Следва да се обърне особено внимание, за да се гарантира, че хидрофилните изпитвани вещества се инкорпорират в среда от носители, която навлажнява кожата и не се изпарява веднага чрез инкорпорирването на подходящи солубилизатори (напр. 1 % плуроник — Pluronic® L92). Поради тази причина носителите на изцяло водна основа трябва да бъдат избягвани.

▼ M3

20. Обработката на лимфни възли от отделни мишки дава възможност за оценка на вариабилността между животните и за статистическо сравнение на разликата между изпитваното вещество и измерванията в третираната с носителя контролна група (вж. точка 33). В допълнение към това оценяването на възможността за намаляване на броя на мишките в ПК група е възможно единствено когато се събират индивидуални данни за отделните животни (17). Освен това някои регулаторни органи изискват събирането на индивидуални данни за отделните животни. Редовното събиране на индивидуални данни за отделните животни предоставя предимство по отношение на хуманното отношение към животните, като се избягва дублирането на изпитвания, което би било необходимо, ако резултатите за изпитваното вещество, които първоначално са събрани по един начин (напр. чрез сборни данни за животните), по-късно бъдат разгледани от регулаторни органи с други изисквания (напр. за събиране на индивидуални данни за отделните животни).

Предварително скринингово изпитване

21. При липсата на информация за определянето на най-високата доза за изпитване (вж. точка 18) следва да се извърши предварително скринингово изпитване, за да се определи подходящото ниво на дозата за изпитване при LLNA: BrdU-ELISA. Целта на предварителното скринингово изпитване е да предостави насоки за избора на максималното ниво на дозата, което да бъде използвано в основното изпитване LLNA: BrdU-ELISA, когато не е налична информация за концентрацията, причиняваща системна токсичност (вж. точка 24) и/или прекомерно локално кожно дразнене (вж. точка 23). Изпитваното максимално ниво на дозата следва да бъде 100 % от изпитваното вещество за течности или максималната възможна концентрация за твърди вещества или суспензии.
22. Предварителното скринингово изпитване се провежда при условия, идентични на тези в основното изпитване LLNA: BrdU-ELISA, с изключение на това, че не се оценява пролиферацията на лимфните възли и могат да бъдат използвани по-малко животни за подложена на дадена доза група. Предлага се използването на едно или две животни за подложена на дадена доза група. Всички мишки се наблюдават ежедневно за всякакви клинични признаци за систематична токсичност или локално дразнене на мястото на прилагане. Телесните тегла се записват преди изпитването и преди завършването му (ден 6). И двете уши на всяка мишка се наблюдават за еритема и резултатите се отчитат, като се използва таблица 1 (20) и глава Б.4 от настоящото приложение). Измерванията на дебелината на ушите се правят, като се използва измервателен уред за дебелината (напр. цифров микрометър или измервателен уред за дебелината Peacock Dial) в ден 1 (преди дозирането), ден 3 (приблизително 48 часа след първата доза) и ден 6. Освен това в ден 6 дебелината на ушите би могла да бъде определена чрез продупчване на ушите и определяне на теглото на взетите продупчени части, което следва да се извърши след като животните бъдат умъртвени по хуманен начин. Показател за прекомерното локално дразнене е балова оценка на еритемата ≥ 3 и/или дебелина на ушите в размер на $\geq 25\%$ в който и било от дните с измервания (21) (22). Най-високата доза, избрана за основното изпитване LLNA: BrdU-ELISA, ще бъде следващата по-ниска доза от поредицата от концентрации в предварителния скрининг (вж. точка 18), която не причинява системна токсичност и/или прекомерно локално кожно дразнене.

Таблица 1

Оценки на еритемата

Наблюдение	Балова оценка
Отсъствие на еритема	0
Много слаба еритема (едва забележима)	1
Добре изразена еритема	2

▼ M3

Наблюдение	Балова оценка
Умерена до тежка еритема	3
Тежка еритема (силно зачервяване — с цвят на цвекло) до образуване на есхара, което не позволява да се отчете баловата оценка на еритемата	4

23. В допълнение към увеличаване на дебелината на ушите с 25 % (21) (22), за идентифициране на дразнители при LLNA също така се използва статистически значимо увеличаване на дебелината на ушите при третираните мишки в сравнение с контролните мишки (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Въпреки това, макар че могат да възникнат статистически значими увеличения, когато дебелината на ушите е по-малка от 25 %, те не са конкретно свързани с прекомерното дразнене (25) (26) (27) (28) (29).
24. Следните клинични наблюдения могат да показват систематична токсичност (30), когато се използват като част от интегрирана оценка, и поради това могат да показват максималното ниво на дозата, което да се използва в основното LLNA: BrdU-ELISA: промени във функционирането на нервната система (напр. пилоерекция, атаксия, тремори и конвулсии); промени в поведението (напр. агресивност, промяна в хигиената на тялото, изразена промяна в нивото на активност); промени в начина на дишане (т.е. промени в честотата и интензивността на дишането като диспнея, задъханост и хрипове) и промени в консумацията на храна и вода. Освен това в оценката следва да бъдат взети предвид признаци на летаргия и/или липса на реакция и всякакви клинични признаци на нещо повече от лека или момента болка и страдание или намаляване на телесното тегло > 5 % от ден 1 до ден 6, както и смъртността. Умиращите животни, както и животните, които показват признаци на силна болка или страдание, следва да бъдат умъртвени по хуманен начин (31).

Експериментален график на основното изпитване

25. Експерименталният график на изпитването е, както следва:
- *Ден 1:* индивидуално се идентифицира и записва теглото на всяко животно и всяко клинично наблюдение. Прилага се 25 µL подходящо разреден разтвор на изпитваното вещество, както и самостоятелно носителят или положителната контрола (паралелна или скоростна въз основа на лабораторната политика, като се вземат предвид точки 11—15), в горната част на всяко ухо.
 - *Дни 2 и 3:* повтаря се процедурата по прилагане, извършена в ден 1.
 - *Ден 4:* няма третиране.
 - *Ден 5:* инжектира се 0,5 mL (5 mg/мишка) разтвор на BrdU (10 mg/mL) вътрешно перитонеално.
 - *Ден 6:* записва се теглото на всяко животно и всяко клинично наблюдение. Приблизително 24 часа (24 h) след инжектирането на BrdU животните се умъртвяват по хуманен начин. Дрениращите аурикуларни (ушни) лимфни възли от всяко ухо на мишката се отрязват и обработват отделно в буферен физиологичен разтвор с фосфат (PBS) за всяко животно. Подробенности и диаграми за идентифицирането и дисекцията на лимфните възлите могат да бъдат намерени в позоваване (17). За допълнително наблюдение на локалната кожна реакция при основното изпитване в протокола от изпитването могат да бъдат включени допълнителни параметри като оценяване на ушната еритема или измервания на дебелината на ушите (получени или чрез използването на измервателен уред за дебелината, или чрез продупчване на ушите и определяне на теглото на взетите продупчени части при аутопсията).

▼ **M3****Приготвяне на клетъчни суспензии**

26. Клетъчна суспензия от единични клетки се приготвя от клетки от лимфните възли (КЛВ), отрязани двустранно от всяка мишка, чрез леко механично разпръсване през 200-микронни отвори на мрежа от неръждаема стомана или чрез друга приемлива техника за получаване на клетъчна суспензия от единични клетки (напр. използване на пластмасово чукало за еднократна употреба за раздробяване на лимфните възли с последващото им преминаване през найлонова мрежа със 70-микронни отвори). Процедурата за приготвяне на суспензията от КЛВ е от критична важност в това изпитване и поради това всеки оператор следва да усвои предварително уменията за това. Освен това лимфните възли на животните в отрицателната контролна група са малки, поради което е важно да действате внимателно, за да избегнете каквито и да било изкуствени ефекти върху стойностите на SI. Във всеки случай, целевият обем на суспензията, приготвена от КЛВ, следва да бъде приспособен към определен оптимизиран обем (прибл. 15 mL). Оптимизираният обем се основава на постигане на средната абсорбция на отрицателната контролна група в интервала 0,1—0,2.

Определяне на клетъчната пролиферация (измерване на съдържанието на BrdU в ДНК на лимфоцитите)

27. BrdU се измерва с метода ELISA чрез използване на промишлен комплект (напр. Roche Applied Science, Mannheim, Germany, каталожен номер 11 647 229 001). Накратко, 100 µL от суспензията, приготвена от клетки от лимфните възли (КЛВ), се добавя трикратно в резервоарите на микроплата с плоско дъно. След фиксиране и денатурация на КЛВ, във всеки резервоар се добавя анти тяло анти-BrdU и се дава възможност за реакция. Впоследствие анти тялото анти-BrdU се премахва чрез промиване и след това се добавя разтвор субстрат и се позволява образуване на хромоген. След това се измерва абсорбция на 370 nm с референтна дължина на вълната от 492 nm. Във всички случаи условията за провеждане на изпитването следва да бъдат оптимизирани (вж. точка 26).

НАБЛЮДЕНИЯ**Клинични наблюдения**

28. Всяка мишка следва да бъде внимателно наблюдавана поне веднъж дневно за всякакви клинични признаци за локално дразнене на мястото на прилагане или за систематична токсичност. Всички наблюдения систематично се записват, като се водят дневници за всяка мишка. Плановете за наблюдение следва да включват критерии за бързото идентифициране на мишките, които показват признаци на системна токсичност, прекомерно локално кожно дразнене или корозивност на кожата, за да бъдат подложени на евтаназия (31).

Телесни тегла

29. Както е посочено в точка 25, индивидуалните телесни тегла на животните следва да бъдат измерени в началото на изпитването и при планираното умъртвяване на животните по хуманен начин.

ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

30. Резултатите за всяка третирана група се изразяват като среден SI. SI се получава чрез разделяне на средната стойност на индекса на маркиране на BrdU/мишка във всяка група, изследвана с изпитваното вещество, и в положителната контролна група, на средната стойност на индекса на маркиране на BrdU за третираната с разтворителя/носителя контролна група. Средната стойност на SI за контролите, третирани с носителя, е единица.

Индексът на маркиране на BrdU се определя като:

$$\text{Индекс на маркиране на BrdU} = \frac{(\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS}_{\text{празна проба}_{\text{em}}})}{(\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS}_{\text{празна проба}_{\text{ref}}})}$$

където em = дължина на вълната на емисията; и ref = референтна дължина на вълната.

▼ **M3**

31. При процеса на вземане на решение даден резултат се счита за положителен, когато $SI \geq 1,6$ (10). При все това силата на зависимостта доза—отговор статистическата значимост и съгласуваността на разтворителя/носителя и ПК реакциите също могат да бъдат използвани при определянето дали даден граничен резултат (т.е. стойност на SI между 1,6 и 1,9) да бъде обявен за положителен (3) (6) (32).
32. При гранична положителна реакция със стойност на SI между 1,6 и 1,9 ползвателите могат да вземат предвид допълнителна информация като например зависимостта доза—отговор, доказателство за систематична токсичност или прекомерно дразнене и, където е подходящо, статистическата значимост заедно със стойностите на SI, с цел потвърждаване, че тези резултати са положителни (10). Следва да бъде обърнато внимание на различните свойства на изпитваното вещество, включително дали то има структурна връзка с познати кожни сенсibiliзатори, дали причинява прекомерно кожно дразнене при мишките, както и какво е естеството на наблюдаваната зависимост доза—отговор. Тези и други съображения подробно се обсъждат на друго място (4).
33. Събирането на данни на нивото на отделните мишки ще даде възможност за статистически анализ на наличието и степента на зависимостта доза—отговор в данните. Всяка статистическа оценка би могла да включва оценка на зависимостта доза—отговор, както и подходящо направени сравнения между изпитваните групи (напр. сравнения по двойки на дозираните групи с паралелната третирана с разтворителя/носителя контролна група). Статистическите анализи могат да включват например линейна регресия или изпитването на William за оценка на тенденциите в зависимостта доза—отговор и изпитването на Dunnett за сравнения по двойки. При избора на подходящ метод за статистически анализ, изследвателят следва да обърне внимание на възможни различия в дисперсиите и други свързани с тях проблеми, които могат да наложат трансформация на данните или провеждане на статистически анализ без параметри. Във всеки случай на изследвателя може да му се наложи да извърши изчисления за SI и статистически анализи със и без определени точки с данни (понякога наричани „отклоняващи се стойности“).

ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ**Данни**

34. Данните следва да бъдат обобщени в табличен вид, като се посочват индивидуалните стойности на индекса на маркиране на BrdU за отделните животни, средната за групата стойност на индекса на маркиране на BrdU/животно, свързаният с нея граница на отклонение (напр. SD, SEM) и средният SI за всяка подложена на дадена доза група в сравнение с паралелната третирана с разтворителя/носителя контролна група.

Протокол от изпитването

35. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитвани и контролни химикали:

- идентификационни данни (напр. CAS и EC номера, ако са налични; източник, чистота, известни примеси, номер на партидата);
- физична форма и физикохимични свойства (напр. летливост, устойчивост, разтворимост);
- ако е смес, състав и относително съотношение в проценти на елементите.

Разтворител/носител:

- идентификационни данни (чистота; концентрация, където е подходящо; използвано количество);
- обосновка за избора на носител.

▼ M3*Опитни животни:*

- произход на мишките от порода CBA;
- микробиологичен статус на животните, ако е известен;
- брой и възраст на животните;
- произход на животните, условия на отглеждане, диета и т.н.

Условия на изпитване:

- източник, номер на партидата и данни, свързани с осигуряването на качеството/контрола на качеството на производителя (чувствителност и специфичност на анти тялото и границата на откриваемост) за комплекта за ELISA;
- подробна информация за приготвянето и прилагането на изпитваното вещество;
- обосновка за избора на доза (включително резултатите от предварителното скринингово изпитване, ако е проведено);
- използвани концентрации на изпитваното вещество и носителя и общо количество на приложеното изпитвано вещество;
- подробна информация за качеството на храната и водата (включително вид/източник на диетата, водоизточник);
- подробна информация за графици на третиране и вземане на проби;
- методи за измерване на токсичността;
- критерии за считане на изпитванията за положителни или отрицателни;
- подробна информация за всякакви отклонения от протокола и обяснение за това как отклонението влияе на планирането на изпитването и на резултатите от него.

Проверка на надеждността:

- обобщение на резултатите от последната проверка на надеждността, включително информация за използваните изпитвано вещество, концентрация и носител;
- данни за паралелни и/или предишни положителни контроли и паралелни отрицателни контроли (разтворител/носител) за лабораторията, провеждаща изпитването;
- ако не е била включена паралелна положителна контрола, се посочва датата и лабораторният доклад на най-скорошното периодично изпитване с положителна контрола и доклад, в който подробно се представят данните от предишни изпитвания с положителни контроли на лабораторията и който обосновава защо не се провежда паралелна положителна контрола.

Резултати:

- индивидуални тегла на мишките в началото на дозирането и при планираното им умъртвяване по хуманен начин; както и средната стойност на границата на отклонение (напр. SD, SEM) за всяка третирана група;
- признаци на токсичност и време на настъпването им, включително кожно дразнене на мястото на прилагане, ако има такова, за всяко животно;
- таблица на индексите на маркиране на BrdU и стойностите на SI за отделните мишки за всяка третирана група;
- средната стойност и съответната граница на отклонение (напр. SD, SEM) за индекса на маркиране на BrdU/мишка за всяка третирана група и резултатите от анализа на отклоняващите се стойности за всяка третирана група;

▼ M3

— изчисленият SI и подходяща мярка за варибилността, която отчита варибилността между животните както в групата с изпитваното вещество, така и в контролната група;

— зависимостта доза—отговор;

— статистически анализи, където е подходящо.

Обсъждане на резултатите:

— кратък коментар на резултатите, анализ на зависимостта доза—отговор и статистически анализ, където е подходящо, със заключение дали изпитваното вещество следва да се счита за кожен сенсibiliзатор.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline № 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985-997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-33.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.
- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. На разположение на адрес: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258-273.
- (8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274-286.
- (9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249-257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication № 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. На разположение на адрес: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>]

▼ **M3**

- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. На разположение на адрес: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPrept2009.pdf]
- (12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.
- (13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline № 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreesen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. На разположение на адрес: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]
- (18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline № 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. На разположение на адрес: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>]
- (23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

▼ **M3**

- (26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by *Pfiesteria* extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. На разположение на адрес: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].
- (31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- (33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. На разположение на адрес: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

▼ M3

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: степента на близост на съвпадение на резултатите от метода за изпитване и приетите референтни стойности. Това е мярка за ефективността на метода за изпитване и един от аспектите на неговата приложимост. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съвпадение“, за да се обозначи делът на верните резултати на даден метод за изпитване (33).

Еталонно вещество: вещество, което предизвиква или не предизвиква сенсibiliзация, използвано като норма за сравнение с изпитваното вещество. Едно еталонно вещество следва да притежава следните свойства: i) постоянен и надежден източник; ii) структурно и функционално сходство с класа на изпитваните вещества; iii) известни физикохимични характеристики; iv) потвърждаващи данни за известни въздействия; и v) известна ефективност за постигане на желаната реакция.

Вещество с фалшиво отрицателен резултат: изпитвано вещество, неправилно определено като даващо отрицателен резултат или неактивно при даден метод за изпитване, докато в действителност то дава положителен резултат или е активно (33).

Вещество с фалшиво положителен резултат: изпитвано вещество, неправилно определено като даващо положителен резултат или активно при дадено изпитване, докато в действителност то дава отрицателен резултат или е неактивно (33).

Опасност: потенциалът за получаване на неблагоприятен за здравето или екологичен ефект. Неблагоприятният ефект се проявява само при достатъчно голяма степен на експозиция.

Междулабораторна възпроизводимост: мярка за степента, в която различните квалифицирани лаборатории, които използват един и същи протокол и изпитват едни и същи изпитвани вещества, могат да получат качествено и количествено сходни резултати. Междулабораторната възпроизводимост се определя по време на процесите на предварително валидиране и на валидиране и показва степента, в която изпитването може да бъде трансформирано успешно между лабораториите, също наричана възпроизводимост между лабораториите (38).

Вътрешнолабораторна възпроизводимост: определяне на степента, в която квалифицирани служители в рамките на една и съща лаборатория могат да възпроизведат успешно резултатите, като използват конкретен протокол в различни моменти. Също наричана възпроизводимост в рамките на лабораторията (38).

Отклоняваща се стойност: отклоняващата се стойност е наблюдение, което е маркирано като различно от други стойности в произволно избрана извадка от популация.

Осигуряване на качеството: управленски процес, при който спазването на лабораторни стандарти за изпитване, изисквания и процедури за водене на дневници, както и точността на трансфера на данни, се оценява от лица, които са независими от лицата, изпълняващи изпитването.

Надеждност: мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да се извърши възпроизводимо в една и съща лаборатория и между различни лаборатории в течение на времето, когато се използва един и същи протокол. Надеждността се оценява, като се изчислява вътрешно- и междулабораторната възпроизводимост (38).

Кожна сенсibiliзация: имунологичен процес, който възниква, когато податлив индивид е локално изложен на химичен алерген с предизвикващо действие, който предизвиква кожна имунна реакция, водеща до развиването на контактна сенсibiliзация.

Стимуляционен индекс (SI): стойност, изчислявана за оценка на потенциала на дадено изпитвано вещество да предизвиква кожна сенсibiliзация, която представлява съотношението на пролиферацията в третирани групи спрямо тази в паралелната третирани с носителя контролна група.

Изпитвано вещество (също наричано изпитван химикал): всяко вещество или смес, изпитвано(а) чрез използването на настоящия метод за изпитване.

▼ **M4****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 етикетирването (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 LC₅₀ 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⁽¹⁾ или силно дразнещо въздействие, не следва да бъдат изпитвани с настоящия метод за изпитване [вж. GD 39 (8)].

⁽¹⁾ 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.

▼ **M4****ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО**

6. Принципът на изпитването е, че въз основа на поэтапна 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:
- a) не е необходимо по-нататъшно изпитване;
 - b) изпитване на три животни от пол; или
 - v) 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 ± 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

▼ **M4**

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

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. 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 (8).

УСЛОВИЯ НА ЕКСПОЗИЦИЯ**Прилагане на концентрациите**

12. Препоръчва се продължителност на експозицията, фиксирана на четири часа, с изключение на времето за уравнивяване. 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 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.
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 μm и с геометрично стандартно отклонение (σ_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.

▼ M4**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 носителят 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 ± 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.

▼ **M4****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 задържане 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 периодично в зависимост от метода за анализ. Когато се прилага периодично 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).

▼ M4

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 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 (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 заключени 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.

▼ **M4****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 обобщена докладна изследването. В случай на потенциално взривоопасни изпитвани химикали следва да се положат усилия за избягване на условия, предразполагащи експлозия. С оглед избягване на неужно 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.

▼ **M4**

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 отбелязано, 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 разгледани 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.

▼ **M4****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,

▼ **M4**

- време, необходимо за достигане на 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 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 (mg/l , mg/m^3 и т.н.), единици за отношение на обем (напр. ppm, 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 (σ_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 σ_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,

▼ **M4**

- 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 LC₅₀;

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/LC₅₀ 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, етикетирането 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).

▼ M4

- (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. (2nd 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]

▼ M4

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

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

▼ M4*Допълнение 2***Процедура, която трябва да бъде следвана за всяка от началните концентрации за газове (PPM/4H)**Общи бележки ⁽¹⁾

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.

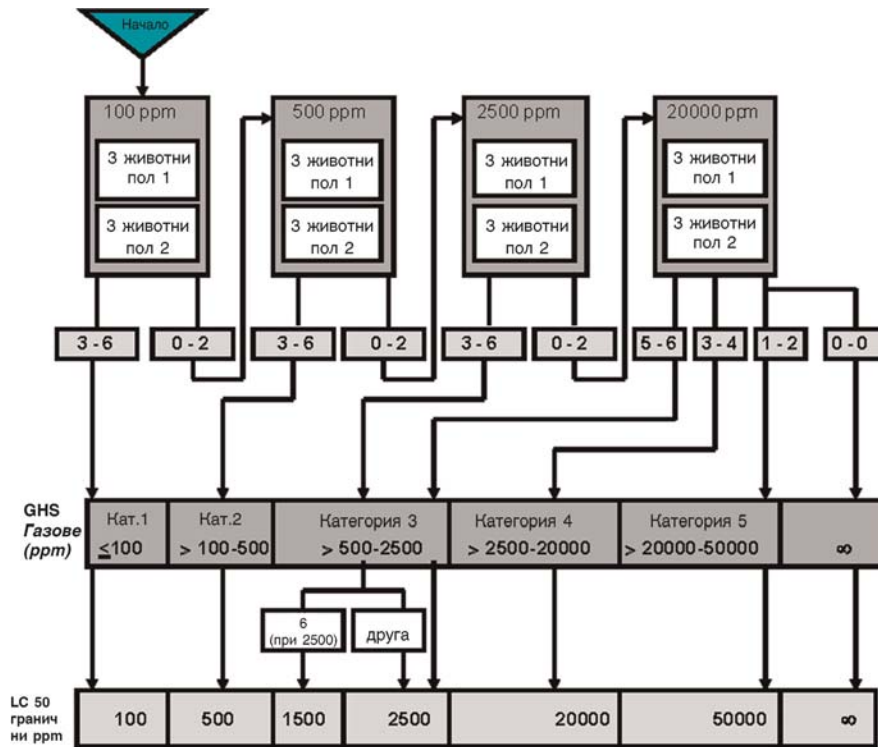
⁽¹⁾ В следващите таблици се прави препратка към Глобалната хармонизирана система за класифициране и етикетирание на химикалите (GHS). В рамките на ЕС равностоен е Регламент (ЕО) № 1272/2008. В случай на остра инхалаторна токсичност по Регламент (ЕО) № 1272/2008 (9) не се прилага категория 5.

▼ M4

Допълнение 2а

Остра инхалаторна токсичност:

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



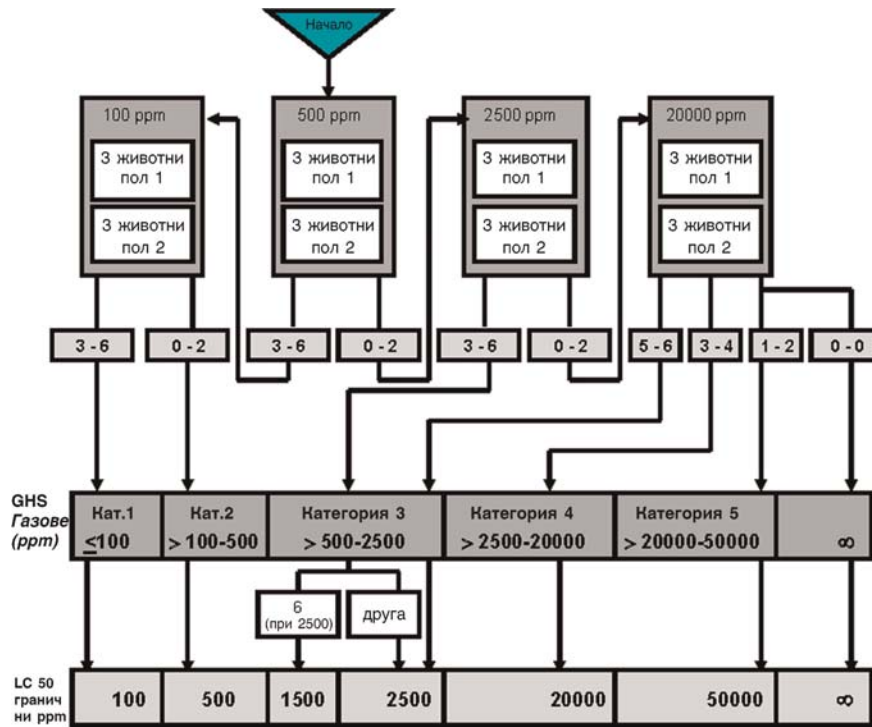
- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклассифицирано
- Изпитване при ≥ 20000 ppm/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼ **M4**

Допълнение 2б

Остра инхалаторна токсичност:

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



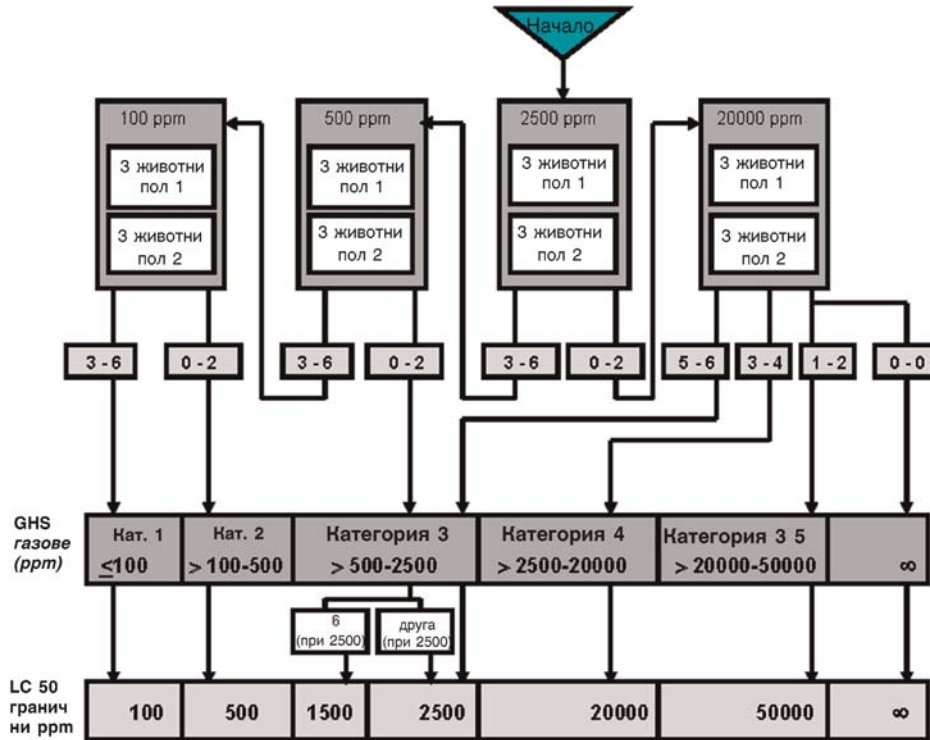
- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклаифицирано
- Изпитване при ≥ 20000 ppm/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼ M4

Допълнение 2в

Остра инхалаторна токсичност:

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



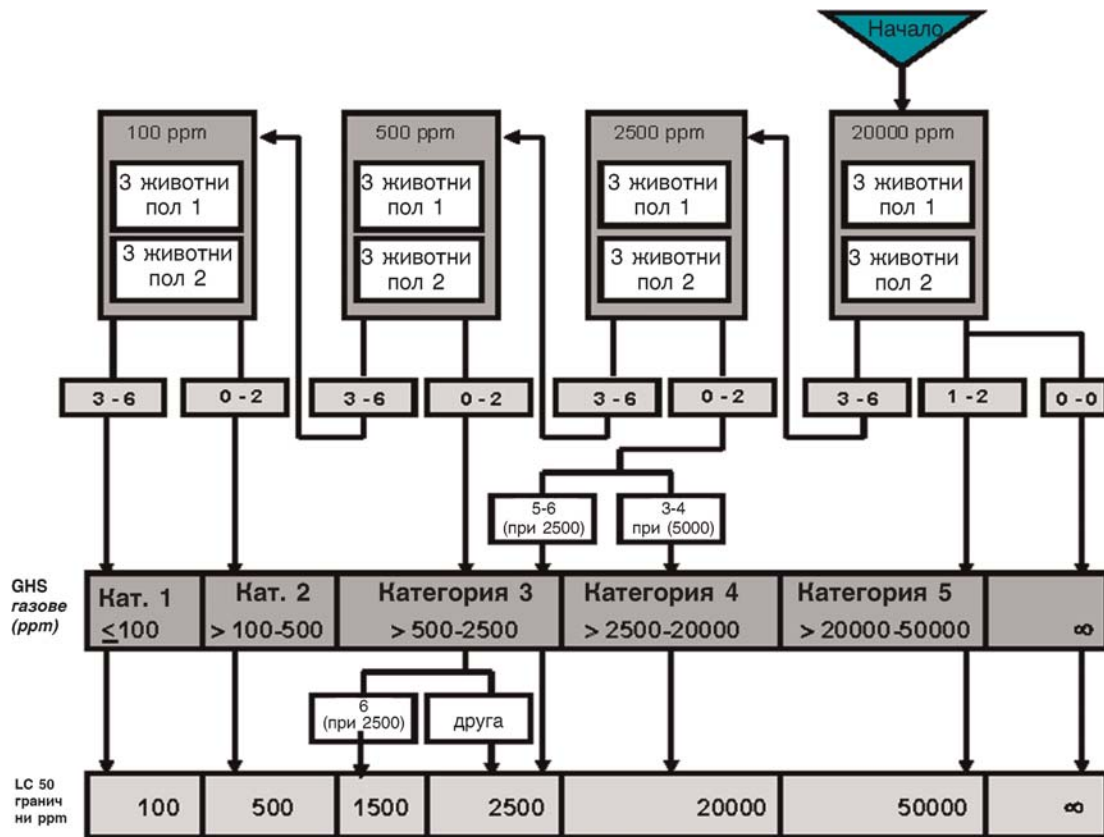
- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклассифицирано
- Изпитване при ≥ 20000 ppm/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼ M4

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 умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклассифицирано
- Изпитване при ≥ 20000 ppm/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼ M4*Допълнение 3***Процедура, която трябва да бъде следвана за всяка от началните концентрации за пари (MG/L/4H)**Общи бележки ⁽¹⁾

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.

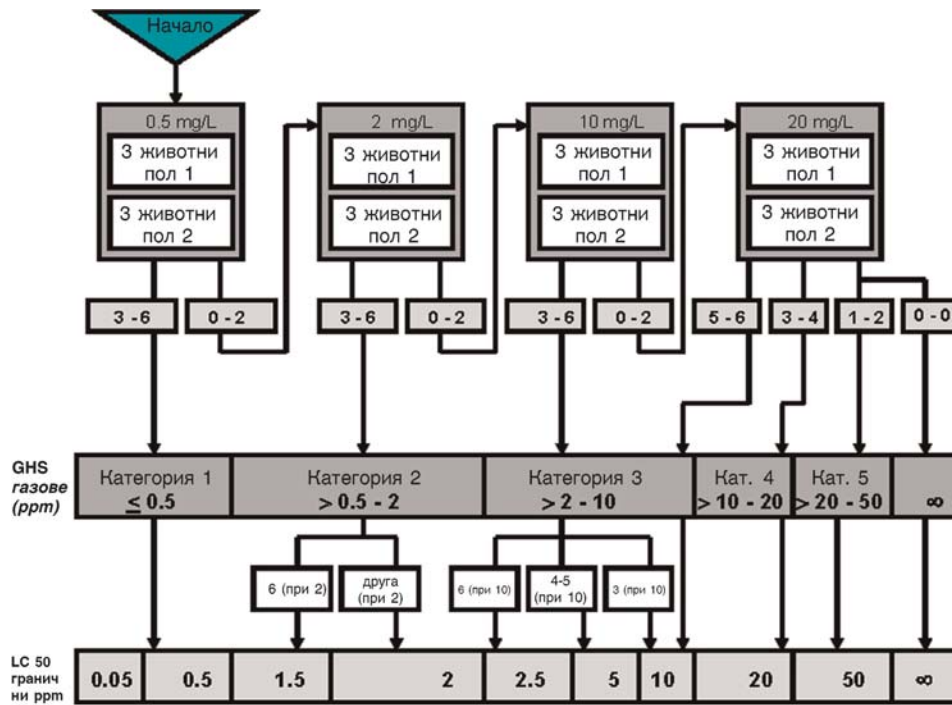
⁽¹⁾ В следващите таблици се прави препратка към Глобалната хармонизирана система за класифициране и етикетиране на химикалите (GHS). В рамките на ЕС равностоен е Регламент (ЕО) № 1272/2008. В случай на остра инхалаторна токсичност по Регламент (ЕО) № 1272/2008 (9) не се прилага категория 5.

▼ M4

Допълнение 3а

Остра инхалаторна токсичност:

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



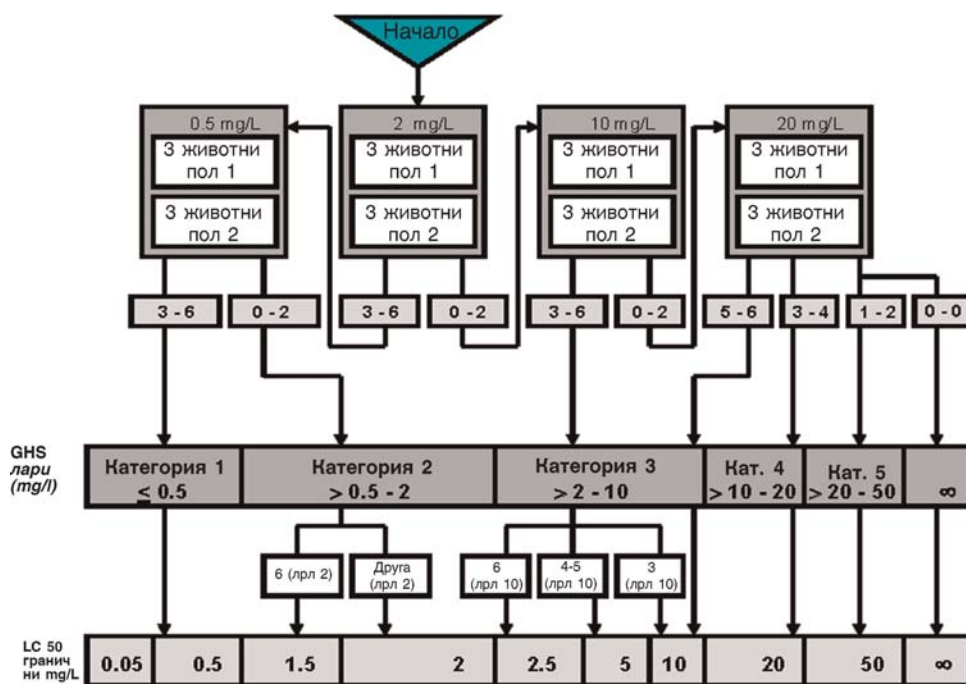
- Използват се $3\sigma + 3\phi$, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞ : неклаифицирано
- Изпитване при 50 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼ M4

Допълнение 3б

Остра инхалаторна токсичност

Процедура на изпитване с начална концентрация от 2 mg/L/4h за пари



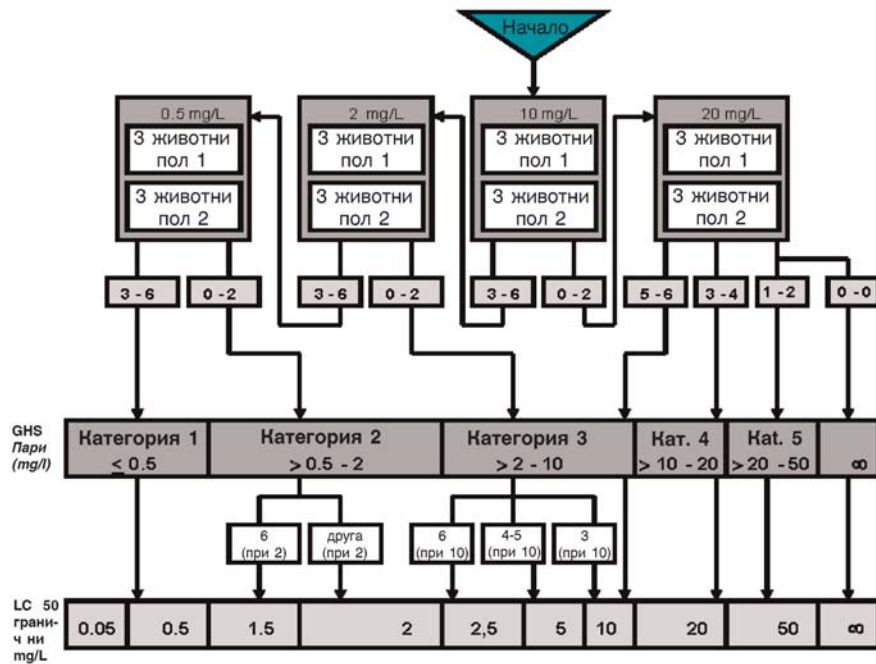
- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклассифицирано
- Изпитване при 50 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼ M4

Допълнение 3в

Остра инхалаторна токсичност

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



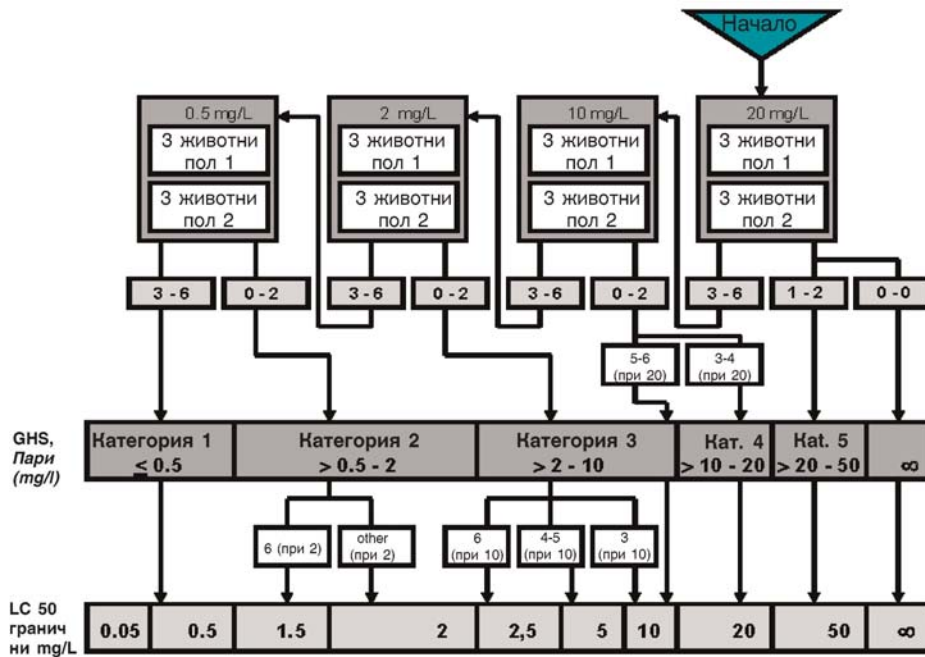
- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклаифицирано
- Изпитване при 50 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼ M4

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 умираещи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклаифицирано
- Изпитване при 50 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼ M4*Допълнение 4***Процедура, която трябва да бъде следвана за всяка от началните концентрации за аерозоли (mg/l/4h)**Общи бележки ⁽¹⁾

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.

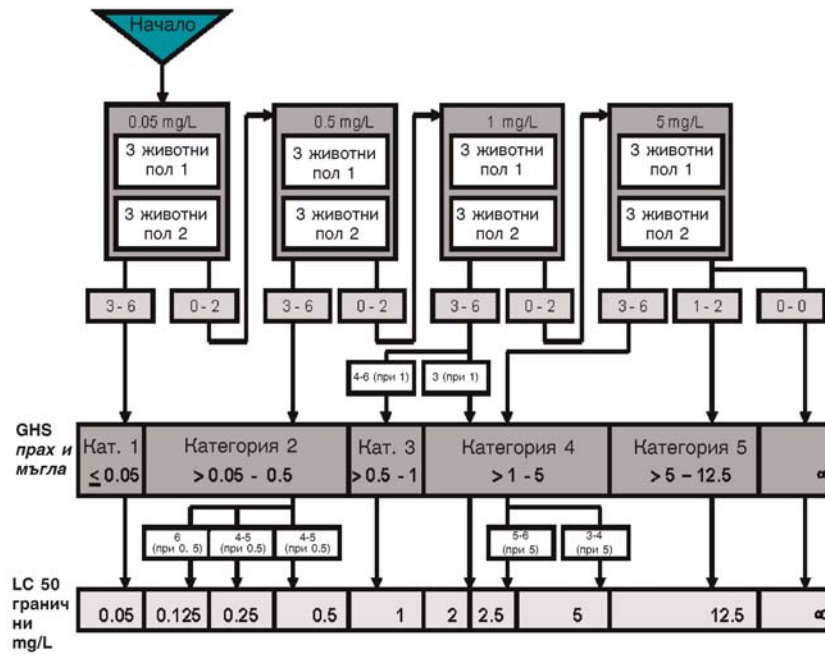
⁽¹⁾ В следващите таблици се прави препратка към Глобалната хармонизирана система за класифициране и етикетирание на химикалите (GHS). В рамките на ЕС равностоеен е Регламент (ЕО) № 1272/2008. В случай на остра инхалаторна токсичност по Регламент (ЕО) № 1272/2008 (9) не се прилага категория 5.

▼ M4

Допълнение 4а

Остра инхалаторна токсичност

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



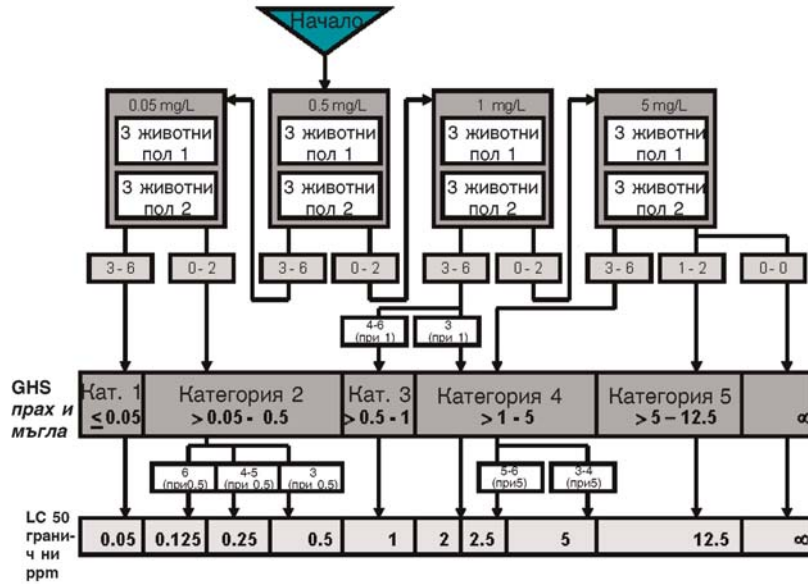
- Използват се $3\sigma + 3\phi$, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умираци или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неklasифицирано
- Изпитване при 50 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼ M4

Допълнение 4б

Остра инхалаторна токсичност

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



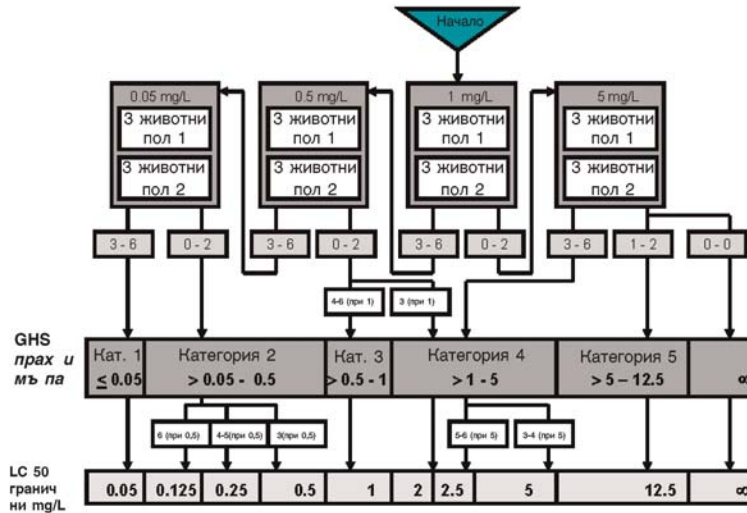
- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞ : неклассифицирано
- Изпитване при 50 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼ M4

Допълнение 4е

Остра инхалаторна токсичност

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



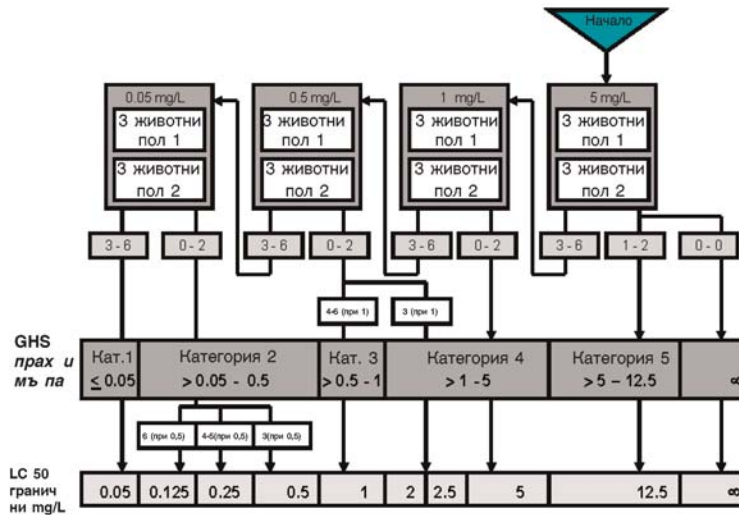
- Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка
- 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване
- GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране
- ∞: неклаифицирано
- Изпитване при 12,5 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼ M4

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)¹⁶

▼ M5

Б.53. ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА НЕВРОТОКСИЧНОСТ ЗА РАЗВИВАЩИЯ СЕ ОРГАНИЗЪМ

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСР (TG) 426 (2007). В Копенхаген през юни 1995 г. работна група на ОИСР за токсичността за репродукцията и за развиващия се организъм обсъди необходимостта от актуализиране на съществуващите указания на ОИСР за изпитвания за токсичност за репродукцията и за развиващия се организъм, и от разработване на нови насоки за крайните точки, които все още не са обхванати (1). Работната група препоръча да бъде изготвено указание за изпитване на невротоксичността за развиващия се организъм въз основа на насоки на Агенцията за опазване на околната среда на САЩ, които впоследствие са били преразгледани (2). През юни 1996 г. в Копенхаген беше проведена втора консултационна среща, за предоставяне на указания на Секретариата за изготвяне на ново указание за изпитване на невротоксичността за развиващия се организъм, включително основните елементи, например подробни данни за избор на животински видове, период на дозиране, период на изпитване, крайни точки, които трябва да бъдат оценени, и критерии за оценка на резултатите. През 1998 г. бяха публикувани Насоки на САЩ за оценка на риска за невротоксичността (3). През октомври 2000 г. бяха проведени успоредно консултационна среща на експерти на ОИСР и работен семинар на Международния институт за науките за живота/Институт за науката за оценка на риска, а през 2005 г. в Токио се проведе консултационна среща на експерти. Тези срещи бяха проведени за обсъждане на научните и техническите въпроси, свързани с настоящите насоки за изпитване, и препоръките от срещите (4)(5)(6)(7) бяха взети предвид при разработването на настоящия метод за изпитване. Допълнителна информация относно прилагането, тълкуването и терминологията, използвана за този метод за изпитване може да бъде намерена в Ръководство на ОИСР № 43 относно „Изпитване и оценка на токсичността за репродукцията“ (8) и Ръководство № 20 относно „Изпитване за невротоксичност“ (9).

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

2. За известен брой химикали се знае, че произвеждат невротоксични ефекти върху развиващия се организъм при хора и други видове (10)(11)(12)(13). Определянето на потенциала за невротоксичност за развиващия се организъм може да е необходимо, за да се направи оценка на токсичните характеристики на даден химикал. Изследванията за невротоксичност за развиващия се организъм се разработват с оглед предоставяне на данни, включително характеризиране на зависимостта доза-отговор, относно възможните функционални и морфологични ефекти върху нервната система на развиващия се организъм на потомството, които могат да възникнат от експозиция *in utero* и по време на ранния стадий на живота.
3. Изпитването за невротоксичност за развиващия се организъм може да се проведе като самостоятелно изследване, да бъде включено в изследване на токсичността за репродукцията и/или в изследване за невротоксичност при полове зрели организми (напр. методи за изпитване Б.34 (14), Б.35 (15), Б.43 (16) или да бъде добавено към изследване на токсичността при пренаталното развитие (напр. метод за изпитване Б.31 (17). Когато изследването за невротоксичност за развиващия се организъм е включено в друго изследване или е прибавено към друго изследване, е наложително да се запази целостността и на двата типа изследвания. Всички изпитвания следва да съответстват на приложимото законодателство или насоки на правителствено равнище или на равнище институции за използването на лабораторни животни в научните изследвания (напр. 18).
4. Лабораторията, извършваща изпитването, следва да вземе предвид цялата налична информация за изпитвания химикал преди провеждането на изследването. Такава информация включва идентичността и структурата на химикала; неговите физични и химични свойства; резултатите от всякакви други *in vitro* или *in vivo* изпитвания за токсичност на химикала; токсикологични данни за структурно свързани химикали; и очакваната(ите) употреба(и) на химикала. Тази информация е необходима, за да се удостовери напълно, че това изпитване е свързано със защитата на човешкото здраве и ще бъде от полза при избора на подходяща начална доза.

▼ M5

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

5. Изпитваният химикал се прилага на животните по време на бременността и кърменето. Майките при животните се подлагат на изпитване за оценка на ефектите при бременни и кърмещи женски и може също така да бъде получена сравнителна информация (майки в сравнение с потомството). За оценка на невротоксичността потомството се избира на случаен принцип от котилото. Оценката се състои от наблюдения за откриване на макроскопски неврологични и поведенчески отклонения, включително оценка на физическото развитие, поведенческата онтогенеза, двигателната активност, двигателната и сензорната функция, и научаването и запаметяването; и оценка на теглото на мозъка и невропатологията през постнаталното развитие и след настъпването на полова зрялост.
6. Когато методът за изпитване се прилага като самостоятелно изследване, могат да бъдат използвани допълнителни налични животни във всяка група за специфични невроповеденчески, невропатологични, неврохимични или електрофизиологични процедури, които да допълват данните, получени от изследванията, препоръчани от настоящия метод за изпитване (16)(19)(20)(21). Допълнителните процедури могат да бъдат особено полезни, когато при емпиричните наблюдения, очакваните ефекти, или механизъм/начин на действие има показания за специфичен тип невротоксичност. Тези допълнителни процедури могат да се използват при майките, както и при новородените. В допълнение също могат да бъдат използвани процедури *ex vivo* или *in vitro*, при условие че тези процедури не изменят целостността на процедурите *in vivo*.

ПОДГОТОВКА ЗА ИЗПИТВАНЕТО

Избор на животински вид

7. Предпочитаният вид е плъхът; ако е необходимо, могат да се използват други видове. Следва да се отбележи обаче, че дните, отнасящи се за периода на бременността и постнаталния период, посочени в настоящия метод за изпитване, са специфични за обичайно използваните породи плъхове, и следва да бъде избран съпоставим период, ако се използва различен вид или необичайна порода. Използването на други животински видове следва да бъде обосновано въз основа на токсикологични, фармакокинетични и/или други данни. Обосновката следва да включва наличието на специфични за съответния животински вид постнатални невроповеденчески и невропатологични оценки. Ако е имало предходно изпитване, в резултат на което са изразени опасения, трябва да бъдат взети под внимание животинският вид/породата, породили опасения. Поради различните характеристики на признаците при различните породи плъхове, следва да има доказателства, че избраната за използване порода има подходящи плодовитост и реагиране. Надеждността и чувствителността на други животински видове за откриване на невротоксичност за развиващия се организъм следва да бъдат документирани.

Условия на отглеждане и хранене

8. Температурата в експерименталното помещение с животните трябва да бъде 22 ± 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 трябва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. Възможно е също така да се обърне цикълът на осветлението преди чифтосването и за продължителността на изследването, за да бъдат извършени оценките на функционалните и поведенческите крайни точки през периода на тъмнина (при червено осветление), т.е. във времето, през което животните обичайно са активни (22). Всякакви промени в цикъла светлина-тъмнина следва да включват подходящ срок за аклиматизация, който да позволява на животните да се адаптират към новия цикъл. За храненето могат да се използват обичайните лабораторни хранителни режими с неограничен достъп до вода за пиене. Типът храна и вода трябва да се отчитат, като и двете следва да бъдат анализирани за наличието на замърсители.

▼ M5

9. Животните могат да се поставят в индивидуални клетки или да се разпределят на малки групи от един и същ пол в общи клетки. Чифтосването трябва да се извърши в клетки, подходящи за тази цел. След доказване на копулация, или не по-късно от 15-ия ден от бременността, чифтосаните животни трябва да бъдат настанени в индивидуални клетки, подходящи за раждане или отглеждане на малките. Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. Когато наближи раждането, в клетките на бременните женски животни следва да бъдат поставени подходящи гнездови материали. Добре известно е, че неправилното манипулиране или стресът по време на бременност могат да доведат до неблагоприятни последици, включително преждевременна загуба на плода и изменение в ембрионалното/постнаталното развитие. За да се предотврати загубата на плода в резултат от фактори, които не са свързани с третирането, с бременните животни следва да се манипулира внимателно и следва да се избягва стресът от външни фактори, като например прекомерния външен шум.

Подготовка на опитните животни

10. Трябва да се използват здрави животни, които са се адаптирали към лабораторните условия и не са били обект на предходни експериментални процедури, освен ако изследването е включено в друго изследване (вж. параграф 3). Опитните животни трябва да се опишат по отношение на вид, порода, източник на доставка, пол, телесно тегло и възраст. Всяко животно трябва да бъде обозначено и маркирано с индивидуален идентификационен номер. Животните от всички опитни групи следва, доколкото е практически възможно, да имат еднакви стойности на телесното тегло и възрастта, и следва да са в рамките на нормалния обхват за изследвания вид и порода. Във всяко ниво на доза следва да се включат млади, полово зрели, нераждали женски животни. Животни от едни и същи родители не следва да се чифтосват и следва да се положат грижи, за да се гарантира това. Ден 0 от бременността (ДБ 0) е денят, в който се наблюдава вагинална запушалка и/или сперматозоиди. Когато от даден доставчик се закупуват животни с определена дата на началото на бременността, следва да се даде достатъчно време за аклиматизация (напр. 2—3 дни). Чифтосаните женски животни следва да бъдат разпределени по непредубеден начин по контролни и опитни групи и, доколкото е възможно, те трябва да бъдат равномерно разпределени между групите (препоръчва се напр. стратифицирана случайна процедура с оглед постигане на равномерно разпределение сред всички групи, като например въз основа на телесното тегло). Женските, осеменени от едно и също мъжко животно, следва да се разпределят равномерно в отделните групи.

ПРОЦЕДУРА**Брой и пол на животните**

11. Всяка изпитвана и контролна група трябва да се състои от достатъчен брой бременни женски животни, които следва да бъдат експонирани на изпитвания химикал, за да се гарантира получаването на достатъчно на брой живо поколение за оценка на невротоксичността. Общо 20 котила се препоръчват за всяко ниво на доза. Планирането на групи с повторение или отлагане на дозирането е разрешено, ако е достигнат общият брой на котилата на група и ако се използват подходящи статистически модели за отчитане на повторенията.
12. На 4-ия постнатален ден (ПНД) или преди него (денят на раждането е ПНД 0), размерът на всяко котило следва да бъде коригиран чрез елиминиране на излишните новородени животни чрез подбор на случаен принцип, за да се получи еднаква големина на котилото за всички котила (23). Големината на котилото следва да не превишава средната големина на котилото за използваната порода гризачи (8—12). Котилото трябва, доколкото е възможно, да се състои от равен брой мъжки и женски новородени животни. Избирателното елиминиране на новородени животни, например въз основа на телесно тегло, не е уместно. След стандартизирането на котилото (бракуване) и преди по-нататъшното изпитване на функционалните крайни точки, отделните новородени, предвидени за изпитване преди отбиването или след отбиването, следва да бъдат идентифицирани поотделно, като се използват всякакви подходящи хуманни методи за идентификация на новородени животни (например 24).

▼ M5

Разпределяне на животни за функционални и поведенчески изпитвания, измерване на теллото на мозъка и оценка на невропатологията

13. Методът за изпитване дава възможност за различни подходи по отношение на разпределянето на животните, експонирани *in utero* и чрез лактация във функционални и поведенчески изпитвания, определяне на половото съзряване, измерване на теллото на мозъка и оценка на невропатологията (25). Други изпитвания на невроповеденчески функции (напр. социално поведение), неврохимия или невропатология могат да се добавят според случая, при условие че целостността на първоначално изискваните изпитвания не е застрашена.
14. Новородените животни се избират от всяка група с определена доза и се разпределят за оценка на крайните точки на 4-тия ПНД или след него. Подборът на новородени животни трябва да бъде извършен по такъв начин, че доколкото е възможно, от всяко котило двата пола във всяка група с определена доза да са представени поравно при всички изпитвания. За изпитване на двигателната активност трябва да се изпитва една и съща двойка мъжки и женски новородени животни във всички възрасти преди отбиването (вж. параграф 35). За всички други изпитвания, същите или отделни двойки от мъжки и женски животни могат да бъдат разпределени към различни поведенчески изпитвания. Може да се наложи различни новородени животни да бъдат разпределени към изпитвания на отбити в сравнение с полово зрели животни, свързани с когнитивната функция, с цел да се избегне невъзможността за разграничаване на ефектите върху тези измервания от възрастта и предхождащото обучение (26)(27). При отбиването (ПНД 21) новородените животни, които не са били подбрани за изпитване, могат да бъдат отстранени по хуманен начин. Всякакви изменения в разпределението на новородените животни следва да бъдат докладвани. Измерваната единица за целите на статистиката следва да бъде котилото (или майката), а не новороденото животно.
15. Съществуват различни начини за разпределяне на новородени за изследване преди отбиването и след отбиването, за когнитивни изпитвания, изследвания на патологията и т.н. (виж фигура 1 за общата схема и допълнение 1 за примери на разпределяне). Препоръчваният минимален брой на животните във всяка група с определена доза за изследвания преди отбиването и след отбиването са, както следва:

Клинични наблюдения и телесно тегло	Всички животни
Подробни клинични наблюдения	20/пол (1/пол/котило)
Тегло на мозъка (след фиксиране) ПНД 11—22	10/пол (1/котило)
Тегло на мозъка (нефиксиран) ~ ПНД 70	10/пол (1/котило)
Невропатология (фиксиране чрез имерсия или чрез перфузия) ПНД 11—22	10/пол (1/котило)
Невропатология (фиксиране чрез перфузия) ПНД ~ 70	10/пол (1/котило)
Полова зрялост	20/пол (1/пол/котило)
Други ориентир за развитието (по избор)	Всички животни
Поведенческа онтогенеза	20/пол (1/пол/котило)
Двигателна активност	20/пол (1/пол/котило)
Двигателна и сензорна функция	20/пол (1/пол/котило)
Научаване и запаметяване	10/пол ^(а) (1/котило)

^(а) В зависимост от чувствителността на изпитванията за когнитивната функция следва да бъде взето предвид изследване на значително по-голям брой животни, например до 1 мъжко и 1 женско от котило (за разпределяне на животните вж. Допълнение 1) (допълнителни указания относно размера на извадката са предоставени в Ръководство № 43 на ОИСП (8)).

▼ M5

Дозирание

16. Следва да се приложат най-малко три нива на доза и да се използва паралелна контролна група. Дозите следва да бъдат избрани в такова съотношение, че с нарастването им да се наблюдава ясно изразено засилване на токсичните ефекти. Освен ограниченията от физично и химично естество, или такива в резултат от биологични свойства на химикала, най-високото ниво на доза трябва да се избира с цел да предизвика известна токсичност при майката (напр. клинични признаци, намаляване на нарастването на телесното тегло (не повече от 10 %) и/или доказване на ограничена от дозата токсичност в прицелен орган). Високата доза може да бъде ограничена до 1 000 mg на kg телесно тегло дневно, с някои изключения. Например, очакваната експозиция на хора може да покаже необходимост да се използва по-високо ниво на доза. Като алтернатива следва да се провеждат пилотни изследвания или предварителни изследвания за определяне на обхвата за определянето на най-високата доза, която да се използва за постигане на минимална степен на токсичност при майката. Ако в стандартно изследване за токсичност за развиващия се организъм или в пилотно изследване е доказано, че изпитваният химикал е токсичен за развиващия се организъм, най-високата доза трябва да бъде максималната доза, която не предизвиква прекомерна токсичност за поколението, или смъртност *in utero*, или сред новородените, или малформации, достатъчни, за да се изключи съдържателна оценка на невротоксичността. Най-ниската доза следва да има за цел да не предизвиква никакви прояви на токсичност, включително невротоксичност, за майката или развиващия се организъм. Следва да се подбират постепенно намаляващи нива на доза с оглед установяване на всеки един свързан с дозата отговор и на нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект (NOAEL), или дози в близост до границата на откриване, които да позволят определянето на еталонна доза. В повечето случаи най-подходящо е да се използва двукратно до четирикратно намаление на всяка доза спрямо най-близката по-висока доза, като включването на допълнителна четвърта група с определена доза често е за предпочитане пред използването на твърде големи интервали между дозите (напр. повече от 10 пъти).
17. Нивата на дозите следва да се подберат, като се вземат под внимание всички съществуващи токсикологични данни, както и допълнителна информация за метаболизма и токсикокинетиката на изпитвания химикал или на подобни материали. Тази информация може да се използва също и при обосновката на схемата на дозиране. Директното дозиране на новородени животни трябва да се разглежда в светлината на информацията за експозицията и фармакокинетиката (28)(29). Преди провеждането на изследвания за директно дозиране следва внимателно да се разгледат предимствата и недостатъците (30).
18. Паралелната контролна група следва да бъде с фиктивно третиране или контролна група на носител в случаите, когато за въвеждането на изпитвания химикал се използва носител. За всички животни обичайно се прилага един и същ обем от изпитвания химикал или от носителя, в съответствие с телесното тегло. Когато за улесняване на дозирането се използва носител или друга добавка, следва да се вземат предвид следните характеристики: 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 ефекти върху консумирането на храна или вода, или хранителния статус на животните. Носителят следва да не предизвиква ефекти, които биха могли да попречат на тълкуването на изследването, също така следва да не е токсичен от невроведенческа гледна точка и да няма ефекти върху репродукцията или развиващия се организъм. За нови носители в допълнение към контролна група на носител следва да бъде включена група с фиктивно третиране. С животните в контролната(ите) група(и) следва да се борави по същия начин, както с животните от групата за изпитване.

▼ M5

Прилагане на дозите

19. Изпитваният химикал или носителят следва да бъдат прилагани по пътя, който в най-голяма степен съответства на потенциалната експозиция на човека, и въз основа на наличната информация за метаболизма и разпределението в изпитваните животни. Пътят на прилагане обичайно е орален (напр. чрез сонда, чрез храна, чрез питейна вода), но могат да се използват други пътища (например чрез кожата, чрез вдишване) в зависимост от характеристиките и очакваните или познатите пътища на експозиция на човека (допълнителни насоки са представени в Ръководство № 43 (8)). Необходимо е да се даде обосновка за избрания път на прилагане. Изпитваният химикал следва да се прилага приблизително по същото време всеки ден.
20. Дозата, прилагана за всяко животно, се определя най-често въз основа на последното измерване на индивидуалното телесно тегло. Въпреки това трябва да се подхожда предпазливо, когато се определят дозите през последната третина от бременността. Ако е забелязана прекалена токсичност при третираните майки, тези животни следва да бъдат умъртвени по хуманен начин.
21. Изпитваният химикал или носителят следва, като минимум, да се прилагат ежедневно при чифтосаните женски животни от времето на имплантация (ДБ 6) по време на кърменето (ПНД 21), така че новородените да бъдат експонирани на въздействието на изпитвания химикал в периодите на пренаталното и постнаталното неврологично развитие. Възрастта, на която да започне дозирането, и продължителността и честотата на дозиране могат да бъдат коригирани, ако има доказателства в подкрепа на постановка на изпитването, която съответства в по-голяма степен на експозицията на човека. Продължителността на дозирането следва да се коригира за други видове, за да се гарантира експозиция през всички ранни периоди на развитието на мозъка (т.е. еквивалентна на пренаталното и ранното постнатално развитие на човешкия мозък). Дозирането може да започне от датата на започване на бременността (ДБ 0), въпреки че трябва да се обърне внимание на потенциала на изпитвания химикал да предизвика предимплантационна загуба. При прилагане, започващо от ДБ 6, този риск би бил избягнат, но етапите на развиващия се организъм между ДБ 0 и ДБ 6 не биха били третирани. Когато дадена лаборатория закупува животни с определена дата на чифтосването, се счита за непрактично дозирането да започва в ДБ 0, и по този начин ДБ 6 би бил уместен ден за започването. Лабораторията, провеждаща изпитването, следва да определи схемата на третиране в съответствие с относимата информация за ефектите на изпитвания химикал, с предходния опит и с логистични съображения; това може да включва разширяване на периода на дозирането след отбиването. Дозиране не следва да се прилага в деня на раждането за тези животни, при които раждането на цялото потомство още не е приключило. Като цяло се приема, че експозицията на новородените ще се извърши чрез майчиното мляко; въпреки това обаче трябва да бъде взето предвид директно дозиране в тези случаи, в които не е доказана продължителна експозиция на потомството. Доказателства за непрекъсната експозиция могат да бъдат изведени *например* от фармакокинетична информация, токсичност за потомството или промени в биомаркерите (28).

НАБЛЮДЕНИЯ**Наблюдения на майки**

22. Всички майки трябва да бъдат внимателно наблюдавани най-малко веднъж на ден, във връзка с тяхното здравословно състояние, включително за заболяемост и смъртност.
23. По време на периодите на третиране и наблюдение следва периодично да се извършват по-подробни клинични наблюдения (най-малко два пъти при дозиране през периода на бременността и два пъти през периода на кърменето) като се използват най-малко десет майки за всяко ниво на доза. Животните следва да се наблюдават извън клетката от обучени техници, които не са запознати с третирането на животните, като се използват стандартни процедури за свеждане до минимум на отклоненията, свързани със стреса на животните и с наблюдателите, и за максимална надеждност при резултатите между различните наблюдатели. Когато е възможно, е препоръчително наблюденията в дадено изследване да се извършват от един и същ специалист.

▼ M5

24. Наличието на наблюдавани признаци трябва да се записва. Когато е възможно, големината (размерът) на наблюдаваните признаци също трябва да бъде записана. Клиничните наблюдения трябва да включват изменения в кожа, козина, очи, лигавици, поява на секречия и автономна дейност (напр. лакримация, пилоерекция, размер на зениците, необичайни респираторни модели и/или дишане през устата и някакви необичайни признаци на уриниране и дефекация), но без да се ограничават до тях.
25. Всякакви необичайни отговори, свързани с положение на тялото, ниво на активност (напр. понижено или повишено проучване на стандартната площ) и координация на движенията, трябва също да бъдат отбелязани. Следва да бъдат записвани промените в походката (напр. клатушкаща се „патешка“ походка, атаксия), стойката (напр. прегърбване) и реактивността при боравене, поставяне или други стимули на околната среда, както и наличието на клонични или тонични движения, конвулсии, тремори, стереотипно (например прекомерно поддържане на външния вид, необичайни движения на главата, повтарящо се обикаляне в кръг), необичайно (например хапане или прекомерно облизване, самоосакатяване, вървене назад, издаване на звуци) или агресивно поведение.
26. Признаците за токсичност следва да се записват, включително ден на поява, по кое време през деня, степен и продължителност.
27. Животните следва да бъдат теглени по време на дозиране поне веднъж седмично в хода на изследването, в деня на раждането или близо до него, както и в ПНД 21 (отбиване). При проучвания със сонда майките следва да бъдат теглени поне два пъти седмично. Дозите следва да бъдат коригирани по време на всяко измерване на телесното тегло, както е уместно. Консумацията на храна трябва да се измерва веднъж седмично, като минимум по време на бременността и кърменето. Консумацията на вода трябва да се измерва поне един път седмично, ако експозицията е чрез осигуряването на вода.

Наблюдения на потомството

28. Всички животни от потомството трябва да бъдат внимателно наблюдавани най-малко ежедневно за признаци на токсичност и за заболяемост и смъртност.
29. По време на периодите на третиране и наблюдение следва периодично да се извършват по-подробни клинични наблюдения на потомството. Потомството (най-малко едно новородено от пол от котило) следва да се наблюдава от обучени техници, които не са запознати с третирането на животните, като се използват стандартни процедури за свеждане до минимум на отклоненията, и за максимална надеждност при резултатите между различните наблюдатели. Когато е възможно, е препоръчително наблюденията да се извършват от един и същ техник. Като минимум, крайните точки, описани в параграфи 24 и 25, следва да бъдат подложени на мониторинг, както е подходящо за наблюдавания етап на развитие на развиващия се организъм.
30. Всички признаци за токсичност в потомството следва да се записват, включително ден на поява, по кое време през деня, степен и продължителност.

Физически ориентир и ориентир за развиващия се организъм

31. Промените в ориентирите за развитието преди отбиването (например разтварянето на ушната мида, отварянето на очите, поникването на резците) са тясно свързани с телесното тегло (30)(31). Телесното тегло може да бъде най-добрият показател за физическото развитие. Следователно измерването на ориентирите за развитието се препоръчва само когато преди това е доказано, че тези крайни точки ще предоставят допълнителна информация. Графикът за оценката на тези параметри е посочен в Таблица 1. В зависимост от очакваните ефекти и резултатите от първоначалните измервания, може да е препоръчително да се добавят допълнителни времеви точки или да се извършат измервания при други етапи на развитие.

▼ M5

32. Препоръчително е при оценката на физическото развитие да се използва възрастта след половия акт вместо постнаталната възраст (33). Ако новородените се изпитват в деня на отбиването, препоръчва се това изпитване да се извърши преди действителното отбиване, за да се избегне водещият до невъзможност за разграничаване ефект от стреса, свързан с отбиването. В допълнение към това изпитването на новородените животни след отбиването не следва да се провежда през двата дни след отбиването.

Таблица 1

График за оценката на физическите ориентри, ориентрите за развиващия се организъм и функционалните/поведенческите крайни точки ^(a)

Възрастови периоди Крайни точки	Преди отбиване ^(b)	Млади ^(b)	Млади полово зрели ^(b)
Физически ориентри и ориентри за развиващия се организъм			
Наблюдения на телесното тегло и Клинични наблюдения	седмично ^(c)	най-малко веднъж на всеки две седмици	най-малко веднъж на всеки две седмици
Тегло на мозъка	ПНД 22 ^(d)		при умъртвяване
Невропатология	ПНД 22 ^(d)		при умъртвяване
Полова зрялост	—	според случая	—
Други ориентри за развитието ^(e)	според случая	—	—
Функционални/поведенчески крайни точки			
Поведенческа онтогенеза	Най-малко две измервания		
Двигателна активност (включително привикване)	1-3 пъти ^(f)	—	веднъж
Двигателна и сензорна функция	—	веднъж	веднъж
Научаване и запамяване	—	веднъж	веднъж

^(a) В тази таблица се посочва минималният брой пъти на извършване на измерванията. В зависимост от очакваните ефекти и резултатите от първоначалните измервания, може да е препоръчително да се добавят допълнителни времеви точки (напр. възрастни животни) или да се извършат измервания при други етапи на развитие на развиващия се организъм.

^(b) Препоръчва се новородените животни да не се изпитват по време на двата дни след отбиването им (вж. параграф 32). Препоръчаните възрасти за изпитване на млади животни са: научаване и запамяване = ПНД 25 ± 2 ; двигателна и сензорна функция = ПНД 25 ± 2 . Препоръчаните възрасти за изпитване на млади полово зрели животни са ПНД 60—70.

^(c) Телесните тегла трябва да се измерват поне два пъти седмично когато директно се дозират новородени животни за коригиране на дозите във време на бързо наддаване на телесно тегло.

^(d) Теглото на мозъка и невропатологията могат да бъдат оценени на някакъв по-ранен етап (напр. ПНД 11), ако е целесъобразно (вж. параграф 39).

^(e) Други ориентри за развиващия се организъм в допълнение към телесното тегло (напр. отваряне на очите) следва да се записват, когато е подходящо (виж параграф 31).

^(f) Вж. параграф 35.

33. Живите новородени животни трябва да бъдат преброени и полът им да бъде определен, напр. чрез визуална проверка или чрез измерване на разстоянието между ануса и половите органи (34)(35), и всяко новородено животно в рамките на дадено котило трябва да бъде претеглено отделно при раждане или скоро след това, поне веднъж седмично по време на кърменето и най-малко веднъж на всеки две седмици след това. При оценката на половото съзряване поне за един мъжки и един женски индивид от котило трябва да се определят възрастта и телесно тегло на животното при настъпване на отворено състояние на вагината (36) или на отделяне на препуциума (37).

▼ M5

Поведенческа онтогенеза

34. Онтогенезата на избрани поведения следва да се измерва при най-малко едно новородено от всеки пол от котило по време на подходящия възрастов период, като бъдат използвани едни и същи новородени животни през всички дни на изпитване за всички оценявани поведения. Дните на измерване трябва да са разпределени равномерно през този период, за да се определи или нормалната, или свързаната с третирането промяна в онтогенезата на това поведение (38). Ето например някои от поведенията, чиято онтогенеза би могла да бъде оценена: рефлекс за пазене на равновесие, отрицателен геотаксис и двигателна активност (38)(39)(40).

Двигателна активност

35. Двигателната активност трябва да бъде наблюдавана (41)(42)(43)(44)(45) по време на периода преди отбиването и периода на полово зрялост. За изпитване по време на отбиването, вж. параграф 32. Провеждането на изпитването следва да бъде достатъчно дълго, за да се докаже привикване по време на провеждането за нетретиран контроли. Използването на двигателната активност за оценка на поведенческата онтогенеза силно се препоръчва. Ако се използва за изпитване на поведенческата онтогенеза, тогава при изпитването следва да се използват едни и същи животни за всички провеждани изпитвания преди отбиването. Изпитванията трябва да бъдат достатъчно чести, за да се оцени онтогенезата на привикването по време на провеждането (44). Това може да изисква три или повече периоди от време преди и включително в деня на отбиване (напр. ПНД 13, 17, 21). Изпитването на същите животни, или животни от едно котило, следва също така да се провежда в полово зряла възраст в близост до прекратяването на проучването (напр. ПНД 60—70). При необходимост може да се извършва изпитване в допълнителни дни. Двигателната активност трябва да се наблюдава посредством автоматичен апарат за записване на активността, способен да улови и пониженията, и повишенията в активността (т.е. базовата активност, измервана от апарата, не следва да бъде с толкова ниска стойност, че да изключва възможността за откриване на пониженията, нито с толкова висока, че да изключва откриване на повишенията на активността). Всяко устройство следва да бъде изпитвано чрез стандартни процедури, за да се гарантира, доколкото е възможно, надеждността на работата при различните уреди и в различните дни. Доколкото е възможно, третираните групи трябва да бъдат балансирани между устройствата. Всяко животно трябва да се изпитва поотделно. Групите за третиране следва да бъдат балансирани по време на изпитването по такъв начин, че да се избегне невъзможност за разграничаване от циркадните ритми на активност. Следва да се положат усилия, за да се гарантира, че колебанията в условията на изпитването са минимални и не са систематически свързани с третирането. Сред променливите, които могат да засегнат редица измервания, свързани с поведението, включително двигателната активност, са равнището на звука, размерът и формата на изпитвателната клетка, температурата, относителната влажност, условията на осветление, миризмите, използването на обитаваната от животното клетка, или на нова изпитвателна клетка, и свързаните с околната среда причини за разсейване.

Двигателна и сензорна функция

36. Двигателната и сензорна функция следва да бъде подробно изследвана най-малко веднъж за млади животни и веднъж за млади полово зрели животни (напр. ПНД 60—70). За изпитване по време на отбиването, вж. параграф 32. Следва да се извършват достатъчно изпитвания, за да се гарантира адекватно количествено вземане на проби на сензорни модалности (напр. сомато-сензорни, вестибуларни) и двигателни функции (напр. сила, координация). Няколко примера за изпитвания на двигателната и сензорна функция са реакцията на екстензор на натиск (46), рефлексът за пазене на равновесие, привикването към интензивни слухови стимули (47)(48)(40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) и евокираните потенциали (55).

▼ **M5****Изпитвания за научаване и запаметяване**

37. Следва да се проведе изпитване за научаване и запаметяване — след отбиването (напр. 25 ± 2 дни) и при млади полово зрели животни (ПНД 60 и по-възрастни). За изпитване по време на отбиването, вж. параграф 32. Същото(ите) или отделно(и) изпитване(ия) може да се използва(т) при тези два етапа на развитие. Разрешена е известна гъвкавост при избора на изпитването(ията) за научаване и запаметяване при отбити и полово зрели плъхове. Въпреки това, изпитването(ията), трябва да бъде(ат) проектирано(и) по такъв начин, че да изпълнява(т) два критерия. Първо, научаването трябва да се оценява или като промяна при няколко повтарящи се опита или сесии за научаване, или в изпитвания, които включват един опит, спрямо състояние, при което се контролират неасоциативните ефекти от обучението. Второ, изпитването(ията), следва да включва(т) някои мерки за запаметяване (краткосрочно или дългосрочно) в допълнение към първоначалното научаване (придобиване), но тази мярка за запаметяване не може да бъде докладвана при липса на измерване на придобиването, получено от същото изпитване. Ако изпитването(ията) за научаване и запаметяване разкрие(ят) ефект на изпитвания химикал, могат да бъдат предвидени допълнителни изпитвания, за да се изключат алтернативни тълкувания, основаващи се на промени в сетивния, мотивационния и/или двигателния капацитети. В допълнение към посочените по-горе два критерия се препоръчва изпитването за научаване и запаметяване да се избира въз основа на доказаната му чувствителност към изследвания клас химикал, ако е налична такава информация в литературата. При липса на такава информация примери за изпитвания, които биха могли да бъдат извършени при спазването на горепосочените критерии, включват: пасивно избягване (43)(56)(57), определяне на обект след закъснение за полово зрели плъхове (58) и за плъхове преди отбиване (59), кондициониране на обонянето (43)(60), воден лабиринт на Morris (61)(62)(63), лабиринт на Biel или Cincinnati (64)(65), лабиринт с радиално рамо (66) T-образен лабиринт (43) придобиване и поддържане на програмирано поведение (26)(67)(68). Допълнителни изпитвания са описани в литературата за отбити (26)(27) и полово зрели плъхове (19)(20).

Оглед при аутопсия

38. Животните майки могат да бъдат подложени на евтаназия след отбиването на потомството.
39. Невропатологичната оценка на потомството се провежда, като се използва тъкани от животни, умъртвени по хуманен начин в ПНД 22 или на по-ранен етап между ПНД 11 и ПНД 22, както и при прекратяване на проучването. За потомството, умъртвено през ПНД 22, следва да бъдат оценени мозъчни тъкани; за животни, умъртвени при прекратяване на изпитването, трябва да бъдат оценени тъкани както от централната нервна система (ЦНС), така и от периферната нервна система (ПНС). Животни, умъртвени през ПНД 22 или преди това, могат да бъдат фиксирани или чрез имерсия, или и чрез перфузия. Животни, умъртвени при прекратяване на проучването, следва да бъдат фиксирани чрез перфузия. Всички аспекти от подготовката на проби от тъкани, от перфузията на животни през дисекцията на проби от тъкани, обработката на тъкани и оцветяването на предметните стъкла, трябва да са по план, балансиран така, че всяка партида да съдържа представителни извадки от всяка група с определена доза. Допълнителни насоки относно невропатологията могат да бъдат намерени в Ръководство № 20 на ОИСП (9), виж също (103).

Обработка на проби от тъкани

40. Всички макроскопски аномалии, видими по време на аутопсията, следва да се отбелязват. Вземите проби от тъкани следва да са представителни за всички основни области на нервната система. Тъканните проби трябва да бъдат задържани в подходящ фиксатор и обработвани съгласно стандартизирани публикувани хистологични протоколи (69)(70)(71)(103). Включването в парафин е приемливо за тъкани от ЦНС и ПНС, но използването на осмий след фиксирането, заедно с включване в епоксидна смола, може да бъде подходящо когато се изисква по-висока разделителна способност (например за периферните нерви, когато има съмнение за наличието на периферна невропатия и/или за морфометричен анализ на периферните нерви). Мозъчната

▼ M5

тъкан, вземана за морфометричен анализ, следва да бъде включена в подходяща среда при всички нива на доза и по едно и също време, за да бъдат избегнати артефакти на свиване, които могат да бъдат свързани с продължително съхранение във фиксатор (6).

Невропатологично изследване

41. Целите на качествено изследване са:

- i) идентифициране на области в нервната система, доказващи невропатологични изменения;
- ii) идентифициране на типове невропатологични изменения в резултат от експозиция на изпитвания химикал; както и
- iii) определяне на обхвата на силата на невропатологичните изменения.

Представителни хистологични срезове от тъканните проби трябва да бъдат изследвани микроскопски от подходящо обучен патолог за доказване на невропатологични изменения. Всички невропатологични изменения трябва да бъдат определени със субективна степен, показваща силата им. Оцветяване с хематоксилин и еозин може да е достатъчно за оценката на срезове от мозък за животни, умъртвени по хуманен начин през ПНД 22 или по-рано. За срезове от тъкани от ЦНС и ПНС от животни, умъртвени при прекратяване на изследването обаче се препоръчва оцветяване за миелин (напр. luxol fast blue/cresyl violet) и сребърно оцветяване (напр. оцветяване по Билшовски или по Бодиян). В зависимост от професионалната преценка на патолога и от вида на наблюдаваните изменения, може да се счете за подходящо друго оцветяване за идентифициране и характеризиране на конкретни типове изменения (напр. глиален фибриларен кисел протеин (GFAP) или хистохимия на лецитин за оценка на глиални и микроглиални изменения (72), Fluoro-jade за откриване на некроза (73)(74), или сребърно оцветяване, специфично за неврална дегенерация (75)).

42. Следва да бъде извършена морфометрична (количествена) оценка, тъй като тези данни могат да допринесат за откриване на свързан с третирането ефект и са полезни при тълкуването на свързани с третирането разлики в теглото или морфологията на мозъка (76)(77). Проби от нервна тъкан трябва да се вземат и подготвят, за да се даде възможност за извършване на морфометрична оценка. Морфометричните оценки могат да включват например линейни измервания или измерване на площ на специфични области от мозъка (78). Линейните измервания и измерването на площ изискват използване на хомоложни срезове, внимателно подбрани въз основа на надеждни микроскопски ориентирни (6). Може да се използва стереология за установяване на свързани с третирането ефекти върху параметри като обем или брой на клетките за специфични невроанатомични области (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. Мозъкът трябва да бъде изследван за всякакви доказателства за свързани с третирането невропатологични изменения, като следва да бъдат взети подходящи проби от всички основни области на мозъка (напр. обонятелни луковици, мозъчна кора, хипокампус, базални ганглии, таламус, хипоталамус, среден мозък (тектум, тегментум и малкомозъчни крачета), мост, продълговат мозък, малък мозък), за да се осигури задълбочено проучване. Важно е срезовете за всички животни да се вземат на едно и също ниво. При умъртвени по хуманен начин при прекратяване на изследването полово зрели животни следва да се пробовземат представителни срезове от гръбначния мозък и ПНС. Изследваните области следва да включват окото с оптичния нерв и ретината, гръбначния мозък при шийното и поясното наддебеление, дорзалните и вентралните коренови влакна, проксималния седалищен нерв, проксималния тибиялен нерв (при колянното) и тибиялното нервно разклонение на мускулите на прасеца. Срезове от гръбначния мозък и периферните нерви следва да включват както напречни, така и надлъжни срезове.

▼ M5

44. Невропатологичната оценка следва да включва изследване за показания за свързани с развиващия се организъм увреждания на нервната система (6)(85)(86)(87)(88)(89), в допълнение към клетъчните изменения (напр. невронална вакуолизация, дегенерация, некроза) и изменения в тъканите (напр. глиоза, левкоцитна инфилтрация, образуване на кисти). В това отношение е важно свързаните с третирането ефекти да бъдат разграничени от нормалните събития, свързани с развиващия се организъм, за които е известно, че се появяват на етапа на развитие, съответстващ на времето на умъртвяването (90). Примери за важни изменения, показателни за инсулт, свързан с развиващия се организъм, включват, но не се ограничават до:

- изменения в макроскопския размер или формата на обонятелните луковици, главния мозък или малкия мозък;
- изменения в относителния размер на различни области на мозъка, включително намаляване или увеличаване на размера на областите вследствие на загуба или устойчивост на обичайно преходни популации от клетки или проекции на аксони (напр. външен зародишен пласт на малкия мозък, мазолесто тяло);
- изменения в пролиферацията, миграцията и диференциацията, показание за което са области с необикновено силна апоптоза или некроза, клъстери или разпръснати популации на ектопични, дезориентирани или деформирани неврони или изменения в относителния размер на отделните пластове на коровите структури;
- изменения в моделите на миелинизация, включително цялостно намаляване на размера или изменено оцветяване на миелинизираните структури;
- доказателства за хидроцефалия, по-специално разширяване на вентрикулите, стеноза на водопровода на средния мозък и изтъняване на полукълбата на големия мозък.

Анализ на зависимостта доза-отговор за невропатологични изменения

45. Препоръчва се следната поетапна процедура за качествени и количествени невропатологични анализи. Първо, срезове от групата с висока доза се сравняват с тези от контролната група. Ако не се открива доказателство за невропатологични изменения в животните от групата с висока доза, не се изисква по-нататъшен анализ. Ако се открие доказателство за невропатологични изменения в групата с висока доза, тогава се изследват животните от групите със средна и ниска доза. Ако групата с висока доза е умъртвена поради смърт или друга невъзможна за разграничаване токсичност, групите с висока и със средна доза трябва да се анализират за невропатологични изменения. Ако има показания за невротоксичност в групите с по-ниски дози, в тези групи трябва да се извърши невропатологичен анализ. Ако при качествено или количественото изследване бъдат открити свързани с третирането невропатологични изменения, зависимостта на появата, честотата и степента на силата на уврежданията или на морфометричните изменения от дозата следва да се определи въз основа на оценка на всички животни от всички групи с определена доза. Всички области на мозъка, които показват някакво доказателство за невропатологично изменение, следва да бъдат включени в тази оценка. За всеки тип увреждане следва да бъдат описани характеристиките, използвани за определянето на всяка степен на сила, като се посочват елементите, използвани за разграничаване на всяка степен. Честотата на всеки тип увреждане и неговата степен на сила следва да бъдат записани и следва да бъде направен статистически анализ с цел оценка на естеството на зависимостта доза-отговор. Препоръчва се използването на кодирани предметни стъкла (91).

ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

Данни

46. Данните следва да се докладват индивидуално и обобщени в табличен вид, като за всяка изпитвана група се показват типовете промени и броят на майките, потомството по пол, и котилата, в които се проявява всеки тип промяна. Ако е извършена директна постнатална експозиция на потомството, пътят, продължителността и периодът на експозиция следва да се докладват.

▼ M5

Оценка и тълкуване на резултатите

47. Чрез изследването за невротоксичност за развиващия се организъм се осигурява информация за ефектите от многократната експозиция на даден химикал *in utero* и през ранното постнатално развитие. Тъй като вниманието е съсредоточено както върху общата токсичност, така и върху крайните точки на невротоксичност за развиващия се организъм, резултатите от изследването позволяват да се разграничат неврологичните ефекти върху развиващия се организъм, които се явяват при отсъствие на обща токсичност, свързана с майката, и ефектите, които се проявяват само на равнища, които са токсични и за майката (27). Поради сложните взаимовръзки между плана на изследването, статистическия анализ и биологичната значимост на данните, адекватното тълкуване на данните за токсичността за развиващия се организъм включват експертна оценка (107)(109). При тълкуването на резултатите от изпитването следва да се използва подход, основан на тежестта на доказателствата (20)(92)(93)(94). Моделите на поведенчески или морфологични констатации, ако има такива, както и доказателства за зависимостта доза-отговор следва да бъдат обсъдени. В това охарактеризиране трябва да бъдат включени данни от всички изследвания, относими към оценката на невротоксичността за развиващия се организъм, включително епидемиологични изследвания върху човека или докладвани случаи и експериментални изследвания върху животни (напр. токсикокинетични данни, информация за зависимост структура-активност, данни от други изследвания за токсичност). Това включва връзката между дозите от изпитвания химикал и наличието или отсъствието, появата и степента на всякакви невротоксични ефекти за всеки пол (20)(95).
48. Оценката на данните следва да включва обсъждане както на биологичната, така и на статистическата значимост. Статистическият анализ следва да бъде разглеждан като инструмент, който насочва, а не определя тълкуването на данните. Липса на статистическа значимост не следва да е единствената обосновка за заключение за липсата на свързан с третирането ефект, точно както статистическата значимост не следва да е единствената обосновка за заключение за наличие на свързан с третирането ефект. За предпазване от евентуални неверни отрицателни констатации и присъщите затруднения при „доказване на отрицателното“ следва да бъдат обсъдени положителните и контролните данни за минали периоди, особено когато няма ефекти, свързани с третирането (102)(106). Вероятността за неверни положителни данни следва да се обсъди в светлината на общата статистическа оценка на данните (96). Оценката следва да включва връзката (ако има такава) между наблюдаваните невропатологични и поведенчески изменения.
49. Всички резултати следва да се анализират с помощта на статистически модели, които са подходящи от гледна точка на плана на изследването (108). Изборът на даден параметричен или непараметричен анализ следва да бъде обоснован, като се вземат предвид фактори като естеството на данните (трансформирани или не), и тяхното разпределение, както и относителната надеждност на избрания статистически анализ. Целта и планът на изследването следва да насочат избора на статистически анализи, за да се сведат до минимум грешките от тип I (неверни положителни) и тип II (неверни отрицателни) (96)(97)(104)(105). Изследвания на развиващия се организъм, използващи многораждащи видове, при които се изпитват множество новородени от дадено котило, следва да включват котилото в статистическия модел за предпазване срещу завишен процент грешки от тип I (98)(99)(100)(101). Измерваната единица за целите на статистиката следва да бъде котилото, а не новороденото животно. Експериментите трябва да бъдат планирани по такъв начин, че животните от едно котило да не се третират като независими наблюдения. Всяка многократно измервана крайна точка в един и същ обект следва да се анализира с използване на статистически модели, които отчитат, че тези измервания не са независими.

Доклад от изпитването

50. Докладът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал:

- физична природа и, където е относимо, физични и химични свойства;
- данни за идентифициране, включително източник;

▼ M5

— чистота на сместа, както и известни и/или очаквани онечиствания.

Носител (когато се използва такъв):

— обосновка за избора на носител, когато е различен от вода или физиологичен разтвор.

Изпитвани животни:

— използвани видове и породи животни, и обосновка, ако са различни от плъхове;

— доставчик на изпитваните животни;

— брой, възраст в началото и пол на животните;

— източник, условия на отглеждане, хранителен режим, вода и т.н.;

— индивидуално тегло на животните в началото на изпитването.

Условия на изпитване:

— обосновка за избора на нивото на доза;

— обосновка за пътищата за дозиране и периода от време;

— спецификации на прилаганите дози, включително подробности за разтворителя, обема и физичната форма на прилагания материал;

— подробна информация за това в какъв вид е изпитваният химикал/хранителната смес, постигната концентрация, стабилност и хомогенност на сместа;

— метод, използван за уникалната идентификация на майките и потомството;

— подробно описание на процедурата(ите) за случаен подбор, използвана(и) за определяне на майките за третираните групи, за избор на новородени животни за бракуване, както и за разпределяне на новородени животни по групи за изпитване;

— подробна информация относно прилагането на изпитвания химикал;

— превръщане от концентрация на изпитвания химикал в храна/питейна вода или при вдишване (ppm) в действителна доза (mg на kg телесно тегло дневно), ако е приложимо;

— условия на средата, в която се провежда изпитването;

— подробности за качеството на храната и водата (напр. течаша, дестилирана);

— дати на началото и приключването на изследването.

Наблюдения и процедури за изпитване:

— подробно описание на процедурите, които се използват за стандартизиране на наблюденията и процедурите, както и работни определения при използване на точкови системи за наблюденията;

— списък на всички използвани процедури на изпитване, както и обосновка за тяхното използване;

— подробности за използваните поведенчески/функционални и свързани с патологията, неврохимията или електрофизиологията процедури, включително информация и подробности относно автоматизираните устройства;

— процедури за калибриране и гарантиране на равностойността на устройствата и на балансирането на третираните групи в процедурите за изпитване;

— кратка обосновка, която обяснява всички решения, свързани с професионална преценка.

▼ **M5**

Резултати (индивидуални или обобщени, включително средни стойности и дисперсия, когато е уместно):

- броят на животните в началото на изследването и броят в края на изследването;
- броят на животните и котилата, използвани за всеки метод за изпитване;
- идентификационен номер на всяко животно и котилото, от което идва;
- размер на котилото и средно тегло при раждане по пол;
- телесно тегло и данни за изменението на телесното тегло, включително телесно тегло на майките и потомството при прекратяването;
- данни относно консумацията на храни и, ако е приложимо, относно потреблението на вода (например, ако изпитваният химикал се приема чрез водата);
- данни за отговора във връзка с токсичността, по пол и ниво на доза, включително признаци на токсичност или смъртност, включително време и причина за смъртта, ако е уместно;
- естество, сила, продължителност, ден на поява, по кое време през деня и последващ ход на подробните клинични наблюдения;
- резултати по точкова система за всеки ориентир за развиващия се организъм (тегло, полово съзряване и поведенческа онтогенеза) за всяко време на наблюдение;
- подробности за използваните поведенчески/функционални и свързани с патологията, неврохимията или електрофизиологията констатации по пол, включващи както увеличението, така и намаленията в сравнение с контролите;
- находки при аутопсията;
- тегло на мозъка;
- всякакви диагнози, получени от неврологични признаци и увреждания, включително появили се по естествен път заболявания или състояния;
- изображения на репрезентативни находки;
- изображения с незначително увеличение за установяване на хомоложността на срезове, използвани за морфометрията;
- данни за абсорбцията и метаболизма, включително допълнителни данни от отделно токсикокинетично изследване, ако са налични;
- статистическа обработка на резултатите, включително статистически модели, използвани за анализ на данните и резултатите, независимо дали са значими или не;
- списък на изследователския персонал, включително и професионално обучение.

Обсъждане на резултатите:

- информация за доза-отговор, по пол и група;
- връзка на всякакви други токсични ефекти със заключението за невротоксичния потенциал на изпитвания химикал, по пол и група;
- въздействие на всякаква токсикокинетична информация върху заключенията;
- прилики с ефектите от всякакви известни невротоксиканти;

▼ **M5**

- данни в подкрепа на надеждността и чувствителността на метода за изпитване (т.е. положителни и контролни данни за минали периоди);
- зависимости (ако има такива) между невропатологични и функционални ефекти;
- NOAEL или еталонна доза за майки и потомство, по пол и група.

Заклучения:

- обсъждане на общото тълкуване на данните въз основа на резултатите, включително заключение дали изпитваният химикал е причинил невротоксичност за развиващия се организъм, и NOAEL.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13-14 June 1995.
- (2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Available: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].
- (3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Available: [<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479>].
- (4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. *Environ. Health Perspect.*, 109:79-91.
- (5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Environ. Health Perspect.*, 109:101-111.
- (6) Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. *Environ. Health Perspect.*, 109:93-100.
- (7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23-25 October 2000.
- (8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment № 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008 Available: [[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2008\)16&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en)].
- (9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment № 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Available: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
- (10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12: 173-292.
- (11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition*, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼ M5

- (12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8:188-197.
- (13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.
- (14) Глава Б.34 от настоящото приложение, Изпитване за токсичност за размножаването в едно поколение.
- (15) Глава Б.35 от настоящото приложение, Изпитване за репродуктивна токсичност в две поколения.
- (16) Глава Б.43 от настоящото приложение, Невротоксикологично изследване при гризачи.
- (17) Глава Б.31 от настоящото приложение, Изпитване за оценка на токсичността за пренаталното развитие.
- (18) Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 година относно защитата на животните, използвани за научни цели. *OB L 276*, 20.10.2010 г., стр. 33.
- (19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Available: [<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm>].
- (20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Available: [<http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supplem/ehc223.htm>].
- (21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods, 1st Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.
- (22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:499-509.
- (23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 38:2-6.
- (24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. *Lab. Animal Sci.*, 27:110-112.
- (25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 13:118-136.
- (26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.
- (27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. Academic Press, Orlando.
- (28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.
- (29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. *Int. J. Toxicol.*, 24:87-94.
- (30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. *Toxicol. Sci.*, 49: 1-4.
- (31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- (32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 6:433-439.

▼ M5

- (33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. *Neurotoxicol. Teratol.*, 20:449-457.
- (34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod. Toxicol.*, 13:383-390.
- (35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.*, 58:350-365.
- (36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:579-586.
- (37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol. Reprod.*, 17:298-303.
- (38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12:489-95.
- (39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.*, 23:896-920.
- (40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology*. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 67-100.
- (41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:53-66.
- (42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pp. 37-82.
- (43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.*, 15:117-129.
- (44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. *Dev. Psychobiol.*, 18:247-260.
- (45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13:599-609.
- (46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:1997. 405-411.
- (47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. *Physiol. Behav.*, 64:661-669.
- (48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 40:589-591.
- (49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pp. 287-351
- (50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.*, 59:107-128.
- (51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pp. 181-211.

▼ M5

- (52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:199-211.
- (53) Crofton, K.M., Lassiter, T.L., Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hear. Res.*, 80:25-30.
- (54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 6:437-445.
- (55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pp. 125-145.
- (56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 105:321-332.
- (57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.*, 6:247-296.
- (58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:237-244.
- (59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. *Behav. Neurosci.*, 103:98-105.
- (60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. *Develop. Psychobiol.*, 17:465-479.
- (61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 11:47-60.
- (62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.*, 48:29-69.
- (63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.*, 36:60-90.
- (64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. *Neurotoxicol. Teratol.*, 9:235-241.
- (65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. *Drug Chem. Toxicol.*, 20:387-399.
- (66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:327-332.
- (67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71:342-352.
- (68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *J. Gerontol.*, 36:338-341.
- (69) Fix, A.S., Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. *Toxicol. Pathol.*, 28: 122-131.
- (70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84-107.
- (71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

▼ M5

- (72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. *Toxicol. Pathol.*, 24: 291-304.
- (73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 874:123-130.
- (74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. *Exp. Toxic. Pathol.*, 53:365-372.
- (75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. *Neurotoxicol. Teratol.*, 16, 545-561.
- (76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19:745-755.
- (77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. *Reprod. Toxicol.*, 20:417-432.
- (78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:129-135.
- (79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.
- (80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57: 305-310.
- (81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Res.*, 609: 262-268.
- (82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. *J. Neurocytol.*, 26:707-710.
- (83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci.*, 22:51-61.
- (84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, 130: 813-831.
- (85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). *Teratology*, 49:113-121.
- (86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. *Develop. Brain Res.*, 84:294-298.
- (87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pp. 3-41.
- (88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283:70-74.

▼ M5

- (89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287:1056–1060.
- (90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.
- (91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. *Toxicol. Let.*, 63:127-133.
- (92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. *Environ. Health Perspect.*, 104:401-405.
- (93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A.
- (94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.
- (95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.
- (96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. *Neurotoxicology*, 5:113-126.
- (97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:21-27.
- (98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. *Dev. Psychobiol.*, 6:329-335.
- (99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology*, 12:165-172.
- (100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14: 221-228.
- (101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:587-90.
- (102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 26:345-352.
- (103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A ‘best practices’ approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. *Toxicol. Pathol.* 34:296-313.
- (104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14(3):205-210.
- (105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. *Biometrics*, 41:295-301.
- (106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266-287.
- (107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):288-325.

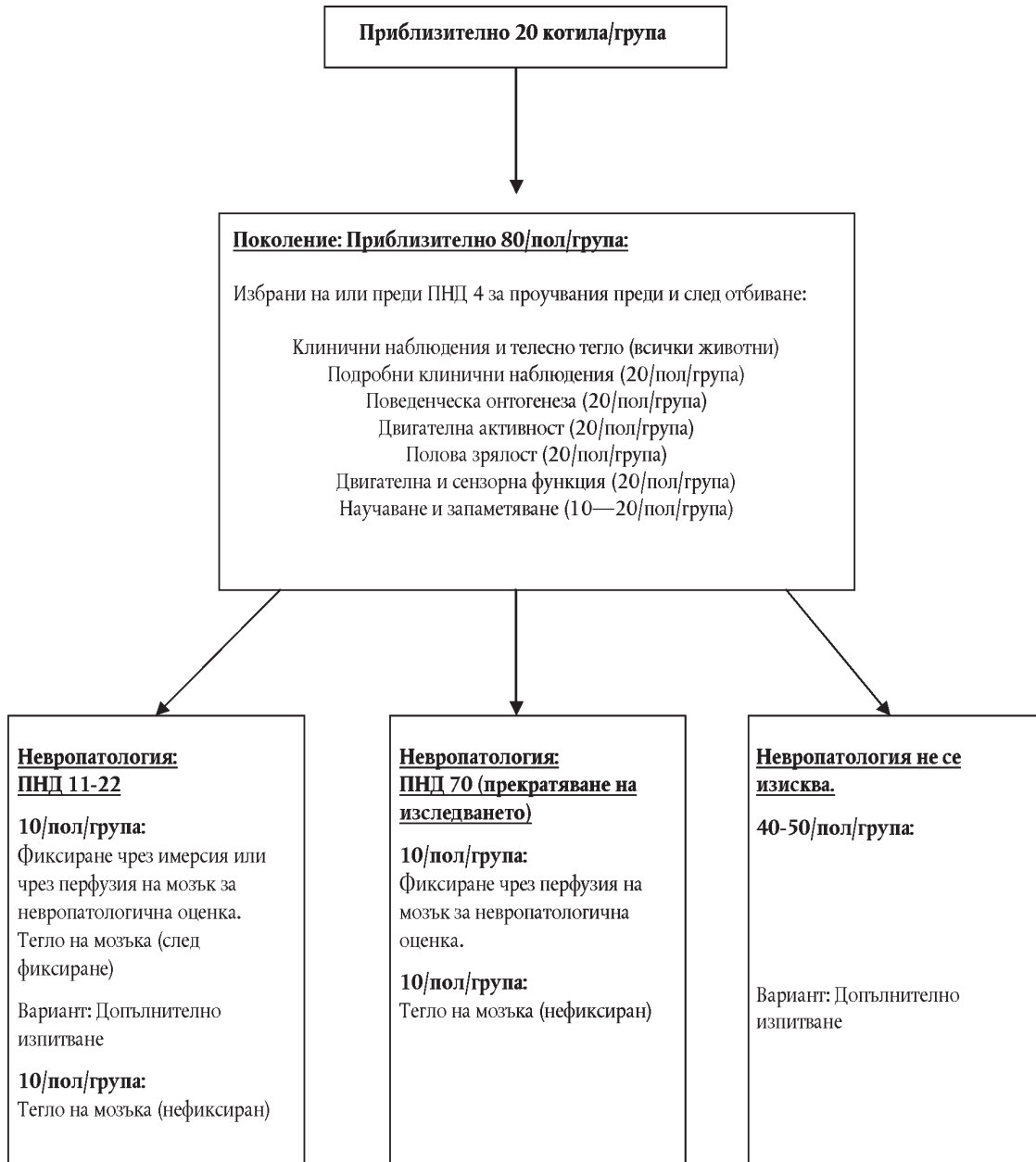
▼ M5

- (108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326-348.
- (109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349-381.

▼ M5

Фигура 1

Обща схема за изпитване за функционални/поведенчески изпитвания, оценка на невропатологията и тегло на мозъка. Тази диаграма се основава на описанието в параграфи 13—15 (ПНД = постнатален ден). Примери за разпределяне на животни са дадени в допълнение 1.



▼ M5

Допълнение 1

1. Примери за възможни разпределения са описани и представени в табличен вид по-долу. Тези примери са предоставени, за да се илюстрира това, че разпределянето на животни за изследване по различни парадигми за изпитване може да се извърши по няколко различни начина.

Пример 1

2. Един набор от 20 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко и 1 женско от котило) се използва за изследване на поведенческата онтогенеза преди отбиване. От тези животни 10 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко или 1 женско от котило) се умъртвяват по хуманен начин през ПНД 22. Мозъкът се отстранява, претегля се и се обработва за хистопатологична оценка. Освен това данните за теглото на мозъка се събират, като се използва нефиксиран мозък от оставащите 10 мъжки и 10 женски животни от ниво на доза.
3. Друг набор от 20 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко и 1 женско от котило) се използва за функционални/поведенчески изпитвания след отбиване (подробни клинични наблюдения, изпитване на двигателната активност, чрез интензивни слухови стимули, на когнитивната функция при млади животни) и оценка на възрастта на полово съзряване. От тези животни 10 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко или 1 женско от котило) се анестезират и се фиксират чрез перфузия при прекратяване на изследването (приблизително през ПНД 70). След допълнителна фиксация *in situ*, мозъкът се отстранява и се обработва за невропатологична оценка.
4. Трети набор от 20 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко и 1 женско от котило) се използва за изпитване на когнитивната функция при млади полово зрели животни (напр. ПНД 60—70). От тези животни, 10 животни от пол и от група (1 мъжко и 1 женско от котило) се умъртвяват при прекратяване на изследването и мозъкът се отстранява и се претегля.
5. Останалите 20 животни от пол и от група се запазени за евентуални допълнителни изпитвания.

Таблица 1

Новородено № (°)		Брой новородени, разпределени за изпитване	Преглед/Изпитване
м	ж		
1	5	20 м + 20 ж	Поведенческа онтогенеза
		10 м + 10 ж	ПНД 22 тегло на мозъка/ невропатология/морфометрия
		10 м + 10 ж	ПНД 22 тегло на мозъка
2	6	20 м + 20 ж	Подробни клинични наблюдения
		20 м + 20 ж	Двигателна активност
		20 м + 20 ж	Полово съзряване
		20 м + 20 ж	Двигателна и сензорна функция
		20 м + 20 ж	Научаване и запаметяване (ПНД 25)
		10 м + 10 ж	Тегло на мозъка/невропатология/морфометрия при млади полово зрели животни ~ ПНД 70

▼ M5

Новородено № ^(а)		Брой новородени, разпределени за изпитване	Преглед/Изпитване
м	ж		
3	7	20 м + 20 ж	Научаване и запаметяване (млади полово зрели животни)
		10 м + 10 ж	Тегло на мозъка при млади полово зрели животни ~ ПНД 70
4	8	—	Резерв от животни за замяна или за допълнителни изпитвания

^(а) За този пример животните са бракувани до оставане на 4 мъжки + 4 женски от котило; мъжките новородени са номерирани с номера от 1 до 4, а женските новородени — от 5 до 8.

Пример 2

6. Един набор от 20 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко и 1 женско от котило) се използва за изследване на поведенческата онтогенеза преди отбиване. От тези животни 10 новородени от пол и от ниво на доза (1 мъжко или 1 женско от котило) се умъртвяват по хуманен начин през ПНД 11. Мозъкът се отстранява, претегля се и се обработва за хистопатологична оценка.
7. Друг набор от 20 животни от всеки пол и ниво на доза (1 мъжко и 1 женско от котило) се използва за изследвания след отбиване (подробни клинични наблюдения, двигателна активност, оценка на възрастта на полово съзряване и двигателна и сензорна функция). От тези животни 10 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко или 1 женско от котило) се анестезират и се фиксират чрез перфузия при прекратяване на изследването (приблизително през ПНД 70). След допълнителна фиксация *in situ*, мозъкът се отстранява, претегля се и се обработва за невропатологична оценка.
8. 10 новородени от пол и от ниво на доза (т.е., 1 мъжко или 1 женско от котило) се използват за изпитване на когнитивната функция при млади и млади полово зрели животни. При изпитването за когнитивната функция през ПНД 23 и при млади полово зрели животни се използват различни животни. При прекратяването изпитваните като полово зрели 10 животни от пол и от група се умъртвяват, мозъкът се отстранява и се претегля.
9. Оставащите 20 животни от пол и от група, които не са избрани за изпитване, се умъртвяват и отстраняват при отбиването.

Таблица 2

Новородено № ^(а)		Брой новородени, разпределени за изпитване	Преглед/Изпитване
м	ж		
1	5	20 м + 20 ж	Поведенческа онтогенеза ПНД 11 тегло на мозъка/ невропатология/морфометрия
		10 м + 10 ж	
2	6	20 м + 20 ж	Подробни клинични наблюдения Двигателна активност Полово съзряване Двигателна и сензорна функция Тегло на мозъка/невропатология/морфометрия при млади полово зрели животни ~ ПНД 70
		20 м + 20 ж	
		20 м + 20 ж	
		20 м + 20 ж	
		10 м + 10 ж	

▼ M5

Новородено № ^(а)		Брой новородени, разпределени за изпитване	Преглед/Изпитване
м	ж		
3	7	10 м + 10 ж ^(б)	Научаване и запаметяване (ПНД 23)
3	7	10 м + 10 ж ^(б)	Научаване и запаметяване (млади полово зрели животни) Тегло на мозъка при млади полово зрели животни
4	8	—	Умъртвени и отстранени животни ПНД 21.

^(а) За този пример животните са бракувани до оставане на 4 мъжки + 4 женски от котило; мъжките новородени са номерирани с номера от 1 до 4, а женските новородени — от 5 до 8.

^(б) Използват се различни новородени за когнитивни изпитвания през ПНД 23 и при млади полово зрели животни (например четни/нечетни котила от общо 20).

Пример 3

10. Един набор от 20 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко и 1 женско от котило) се използва за претегляне на мозъка и оценка на невропатологията през ПНД 11. От тези животни 10 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко или 1 женско от котило) се умъртвяват по хуманен начин през ПНД 11 и мозъкът се отстранява, претегля се и се обработва за хистопатологична оценка. Освен това данните за теглото на мозъка се събират, като се използва нефиксиран мозък от оставащите 10 мъжки и 10 женски животни от ниво на доза.
11. Друг набор от 20 животни от всеки пол и ниво на доза (т.е., 1 мъжко и 1 женско от котило) се използва за поведенческа онтогенеза (двигателна активност), изследвания след отбиване (двигателна активност и оценка на възрастта на полово съзряване) и изпитване на когнитивна функция при млади животни.
12. Друг набор от 20 животни от всеки пол и ниво на доза (т.е., 1 мъжко и 1 женско от котило) се използва за изпитване на двигателната и сензорна функция (чрез интензивни слухови стимули) и подробни клинични наблюдения. От тези животни 10 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко или 1 женско от котило) се анестезират и се фиксират чрез перфузия при прекратяване на изследването (приблизително през ПНД 70). След допълнителна фиксация *in situ*, мозъкът се отстранява, претегля се и се обработва за невропатологична оценка.
13. Друг набор от 20 животни от всеки пол и ниво на доза се използва за изпитване на когнитивната функция при млади полово зрели животни (*m.e.*, 1 мъжко и 1 женско от котило). От тях 10 животни от пол и от група (т.е. 1 мъжко или 1 женско от котило) се умъртвяват при прекратяване на изследването, мозъкът се отстранява и се претегля.

Таблица 3

Новородено № ^(а)		Брой новородени, разпределени за изпитване	Преглед/Изпитване
м	ж		
1	5	10 м + 10 ж	ПНД 11 тегло на мозъка/ невропатология/морфометрия
		10 м + 10 ж	ПНД 11 тегло на мозъка
2	6	20 м + 20 ж	Поведенческа онтогенеза (двигателна активност)
		20 м + 20 ж	Двигателна активност
		20 м + 20 ж	Полово съзряване
		20 м + 20 ж	Научаване и запаметяване (ПНД 27)

▼ M5

Новородено № ^(a)		Брой новородени, разпределени за изпитване	Преглед/Изпитване
м	ж		
3	7	20 м + 20 ж	Изпитване чрез интензивни слухови стимули (млади животни и млади полово зрели животни)
		20 м + 20 ж	Подробни клинични наблюдения
		10 м + 10 ж	Млади полово зрели животни — тегло на мозъка/невропатология/морфометрия ~ ПНД 70
4	8	20 м + 20 ж	Научаване и запаметяване (млади полово зрели животни)
		10 м + 10 ж	Тегло на мозъка при млади полово зрели животни

^(a) За този пример животните са бракувани до оставане на 4 мъжки + 4 женски от котило; мъжките новородени са номерирани с номера от 1 до 4, а женските новородени — от 5 до 8.

▼ M5

Допълнение 2

Определения

Химикал: Вещество или смес

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

▼ M5

Б.54. УТЕРОТРОФИЧНО БИОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ ПРИ ГРИЗАЧИ: КРАТКОСРОЧНО СКРИНИНГОВО ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ЕСТРОГЕННИ СВОЙСТВА

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 440 (2007). През 1998 г. ОИСП стартира с висок приоритет дейност по преразглеждане на съществуващите указания и по разработване на нови указания за скрининг и изпитвания за потенциални нарушители на функциите на ендокринната система (1). Един от елементите на дейността беше да се разработи указание за изпитване за утеротрофично биологично изследване при гризачи. След това утеротрофичното биологично изследване при гризачи бе предмет на обширна програма за валидиране, включително съставянето на подробен информационен документ (2)(3) и провеждането на обширни вътрешно- и междулабораторни изследвания, за да се покаже уместността и възпроизводимостта на биологичното изследване с мощен референтен естроген, слаби естрогенни рецепторни агонисти и отрицателен референтен химикал (4)(5)(6)(7)(8)(9). Този метод за изпитване Б.54 е резултат от опита, натрупан по време на плана на изпитването за валидиране, и получените по този начин резултати с естрогенни агонисти.

2. Утеротрофичното биологично изследване е краткосрочно скринингово изследване, появило се през 1930-те години (27)(28) и за пръв път стандартизирано за скрининг от комитет от експерти през 1962 г. (32)(35). То се основава на увеличаването на теглото на матката или на утеротрофичен отговор (за преглед вж. 29)). С него се оценява способността на даден химикал да проявява биологична активност, съответстваща на агонисти или антагонисти на природни естрогени (напр. 17 β -естрадиол), но използването му за откриване на антагонисти е много по-рядко срещано, отколкото за агонисти. Матката отговаря на естрогени по два начина. Първоначален отговор е увеличението на теглото в резултат на поглъщане на вода. Този отговор е последван от наддаване на тегло в резултат на растеж на тъкан (30). Отговорите на матката при плъхове и при мишки са съпоставими в качествено отношение.

3. Това биологично изследване служи като скринингово изследване *in vivo* и неговото прилагане следва да се разглежда в контекста на „Концептуалната рамка на ОИСП за изпитване и оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система“ (Допълнение 2). В тази концептуална рамка утеротрофичното биологично изследване се съдържа в равнище 3 като изследване *in vivo*, предоставящо данни относно единен ендокринен механизъм, т.е. естрогенност.

4. Утеротрофичното биологично изследване е предназначено да бъде включено в батерия от изпитвания *in vitro* и *in vivo* за установяване на химикали, които имат потенциала да взаимодействат с ендокринната система, които в крайна сметка водят до оценки на риска за човешкото здраве или околната среда. Програмата за валидиране на ОИСП използва както силни, така и слаби естрогенни агонисти, за да направи оценка на пригодността на изследването за идентифициране на естрогенни химикали (4)(5)(6)(7)(8). По този начин, освен добрата вътрешно- и междулабораторна възпроизводимост, беше добре показана чувствителността на изпитвателната процедура за естрогенни агонисти.

5. По отношение на отрицателните химикали, само един „отрицателен“ референтен химикал, който вече беше докладван като отрицателен от утеротрофично изследване, както и от изпитвания *in vitro* на свързването към рецептори и на рецептори, беше включен в програмата за валидиране, но бяха оценени допълнителни изпитвателни данни, които не са свързани с програмата на ОИСП за валидиране, предоставящи допълнителна подкрепа за специфичността на утеротрофичното биологично изследване за скрининг на естрогенни агонисти (16).

▼ M5

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

6. Естрогенните агонисти и антагонисти действат като лиганди за естрогенните рецептори α и β и съответно могат да активират или да потискат транскрипционното действие на рецепторите. Това може да има потенциал да доведе до опасност за здравето, включително до ефекти върху репродукцията и развиващия се организъм. Поради това съществува необходимост от бързо извършване на оценка на даден химикал като възможен естрогенен агонист или антагонист. Макар и даващ информация, афинитетът на даден лиганд към даден естрогенен рецептор или към транскрипционно активиране на репортерни гени *in vitro* е само един от няколко определящи фактори за евентуален риск. Други определящи фактори, зависещи най-малко отчасти от пътя на прилагане и изпитвания химикал, могат да включват метаболитно активиране и деактивиране при влизане в тялото, разпределяне в прицелни тъкани и клирънс от организма. Това води до необходимостта от извършване на скрининг на потенциалното действие на даден химикал *in vivo* при подходящи условия, освен ако характеристиките на химикала по отношение на абсорбция — разпределение — метаболизъм — екскреция (АРМЕ) вече не дават подходяща информация. Отговорът на маточните тъкани на стимулирането с естрогени е бърз и енергичен растеж, особено при лабораторни гризачи, при които еструсът продължава около 4 дни. Различни видове гризачи, особено плъховете, се използват също така широко в изследванията за токсичност за характеризиране на риска. Следователно матката при гризачите е подходящ прицелен орган за скрининг *in vivo* на естрогенни агонисти и антагонисти.
7. Настоящият метод за изпитване се основава на онези протоколи, използвани в изследването на ОИСР за валидиране, които са показали, че са надеждни и възпроизводими във вътрешно- и междубораторни изследвания (5)(7). Понастоящем на разположение съществуват два метода, а именно метод с овариетомизирани полово зрели женски животни (метод с полово зрели животни) и метод с незрели неовариетомизирани животни (метод с незрели животни). В програмата на ОИСР за изпитвания за валидиране е било показано, че и двата метода са със сравнима чувствителност и възпроизводимост. Обаче методът с незрели животни, тъй като те имат невредима хипоталамус-хипофиза-гонадна ос (ос ХХГ), е в известен смисъл по-неспецифичен, но покрива по-широк обхват на изследване от метода с полово зрели животни, тъй като може да предизвика отговор на химикали, които взаимодействат с оста ХХГ, а не просто с естрогенния рецептор. Оста ХХГ при плъховете започва да функционира на около 15-дневна възраст. Преди това, пубертетът не може да се ускори с третирания като гонадотропин-освобождаващ хормон (GnRH). Когато женските започнат да достигат пубертет, преди отварянето на вагината, при женското животно ще има няколко скрити цикли, които не водят до отваряне на вагината или овулация, но при които има известни хормонални колебания. Ако даден химикал стимулира оста ХХГ пряко или непряко, в резултат на това се получава преждевременен пубертет, ранна овулация и ускорено отваряне на вагината. Такъв ефект имат не само химикали, които въздействат на оста ХХГ, но и някои хранителни режими с по-високи нива на енергия от обмяна на веществата отколкото други стимулират растежа и ускоряват отварянето на вагината без да са естрогенни. Таква химикали не биха довели до утеротрофичен отговор при овариетомизирани полово зрели животни, тъй като тяхната ос ХХГ не функционира.
8. От съображения за хуманно отношение към животните следва да се отдаде предпочитание на метода с незрели плъхове, като се избягва предварителна хирургична обработка на животните и се избягва и възможно неизползване на онези животни, при които има показания за навлизане в еструс (вж. параграф 30).

▼ M5

9. Утеротрофичният отговор не е изцяло от естрогенен произход, т.е. химикали, различни от агонисти или антагонисти на естрогени, могат също така да предизвикат отговор. Например, сравнително високи дози на прогестерон, тестостерон или различни синтетични прогестини могат да доведат до стимулиращ отговор (30). Всеки отговор може да бъде анализиран хистологично за втвърдяване и вроговяване на вагината (30). Независимо от възможния произход на отговора, положителният резултат от утеротрофичното биологично изследване обикновено следва да води до предприемане на действия за допълнително изясняване. Допълнителни доказателства за естрогенност могат да се получат от изследвания *in vitro*, като например изследвания на свързването към естрогенен рецептор и изследвания на транскрипционно активиране, или от други изследвания *in vivo*, като например изследването на женски животни в пубертет.
10. Като се има предвид, че утеротрофичното биологично изследване служи като скринингово изследване *in vivo*, възприетият подход на валидиране беше в съответствие както със съображенията за хуманно отношение към животните, така и със стратегията за поетапно изпитване. За тази цел усилията бяха насочени към стриктно валидиране на възпроизводимостта и чувствителността по отношение на естрогенността — основен проблем за много химикали — докато малко усилия бяха насочени към компонента антиестрогенност на изследването. Беше изпитан само един антиестроген със силна активност, тъй като броят на химикалите с ясен антиестрогенен профил (който да не е неясен поради някаква естрогенна активност) е много ограничен. По този начин настоящият метод за изпитване е посветен на естрогенния протокол, докато протоколът, описващ антагонистичния режим от изследването, е включен в Ръководство (37). Възпроизводимостта и чувствителността на изследването за химикали с чисто антиестрогенна дейност ще бъдат по-ясно определени по-късно, след като процедурата на изпитване е била рутинно използвана за известно време и са идентифицирани повече химикали с този начин на действие.
11. 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 местни разпоредби, като например Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 г. относно защитата на животните, използвани за научни цели (38). По-нататъшни указания за хуманното отношение към животните се дават от ОИСП (25).
12. Както при всички изследвания, при които се използват живи животни, от съществено значение е да се гарантира, че данните са наистина необходими преди началото на изследването. Например две условия, при които данните могат да се изискват, са:
- висок потенциал за експозиция (равнище 1 от Концептуалната рамка, допълнение 2) или признаци за естрогенност (равнище 2) за проучване дали такива ефекти могат да настъпят *in vivo*;
 - ефекти, показващи естрогенност при изпитвания *in vivo* на равнище 4 или 5 за доказване, че ефектите са били свързани с естрогенен механизъм, който не може да бъде изяснен с помощта на изпитване *in vitro*.
13. Определенията, използвани за този метод за изпитване, са дадени в допълнение 1.

▼ M5

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

14. За чувствителността на утеротрофичното биологично изследване се разчита на постановка за изпитване на животни, при която хипоталамус-хипофиза-гонадната ос не е функционална, което води до ниски ендогенни нива на циркулиращ естроген. Това ще осигури ниско изходно тегло на матката и максимален обхват на отговор на прилаганите естрогени. Две състояния на чувствителност на естроген на женското животно при гризачите отговарят на това изискване:
- i) незрели женски животни след отбиването и преди пубертета, и
 - ii) млади полово зрели женски животни след овариектомия, с предоставено достатъчно време за регресивно развитие на маточните тъкани.
15. Изпитваният химикал се прилага всекидневно по орален път през сонда или чрез подкожно инжектиране. Постепенни дози от изпитвания химикал се прилагат в най-малко две третирани групи (вж. параграф 33 за насоки) от опитни животни, като се използва по една доза за група и период на прилагане от три последователни дни за метода с незрели животни и минимален период на прилагане от три последователни дни за метода с полово зрели животни. Животните се подлагат на аутопсия приблизително 24 часа след последната доза. За естрогенни агонисти средната маса на матката на третираните групи животни, свързана с носителя, се оценява за статистически значимо нарастване. Статистически значимото нарастване на средната маса на матката на дадена изпитвана група показва положителен отговор при това биологично изследване.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Избор на животински вид

16. Могат да се използват обичайно използваните лабораторни породи гризачи. Например по време на валидирането са били използвани плъхове от породи Sprague-Dawley и Wistar. Породи, при които за матката е известно или се подозира, че дава по-слаб отговор, не трябва да се използват. Лабораторията следва да демонстрира чувствителността на използваната порода, както е описано в параграфи 26 и 27.
17. Плъхове и мишки се използват редовно за утеротрофично биологично изследване от 1930-те години насам. Изследванията на ОИСП за валидиране са били извършвани само с плъхове въз основа на схващането, че се очаква двата вида да са равностойни и поради това един вид трябва да бъде достатъчен за валидиране в световен мащаб, с оглед икономия на ресурси и запазване на животни. Плъхът е избраният вид при повечето изследвания на токсичността за репродукцията и за развиващия се организъм. Като се има предвид, че съществува обширна база данни за минали периоди за мишки и, във връзка с това, за да се разшири обхватът на утеротрофичното биологично изследване при гризачи така, че като изпитван вид да могат да бъдат използвани мишки, е било проведено ограничено последващо изследване за валидиране върху мишки (16). В съответствие с първоначалното намерение за икономия на ресурси и запазване на животни е избран свързващ подход с ограничен брой изпитвани химикали, участващи лаборатории и без изследване на кодирани проби. Това свързващо изследване за валидиране показва, че в качествено и количествено отношение при утеротрофичното биологично изследване на овариектомизирани млади полово зрели мишки има голямо съответствие между данните, получени при плъхове, и тези, получени при мишки. Когато резултатът от дадено утеротрофично биологично изследване може да бъде предварителен по отношение на дългосрочно изследване, това позволява в двете изследвания да се използват животни от същата порода и източник. Свързващият подход беше ограничен до овариектомизирани мишки и докладът не предоставя набор от устойчиви данни за валидиране на модел с незрели животни, следователно моделът с незрели животни с използване на мишки не се разглежда в обхвата на настоящия метод за изпитване.

▼ M5

18. Следователно в някои случаи могат да бъдат използвани мишки вместо плъхове. За този вид следва да бъде направена обосновка въз основа на токсикологични, фармакокинетични и/или други критерии. За мишки е възможно да са необходими изменения на протокола. Например, консумацията на храна на телесно тегло при мишки е по-висока от тази на плъховете и следователно съдържанието на фитоестрогени в храната при мишките следва да бъде по-ниско при мишките, отколкото при плъховете (9)(20)(22).

Условия на отглеждане и хранене

19. Всички процедури трябва да са в съответствие с местните стандарти за полагане на грижи за лабораторни животни. Тези описания на грижите и третирането представляват минимални стандарти и се заменят от местни разпоредби, като например Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 г. относно защитата на животните, използвани за научни цели (38). Температурата в стаята на опитните животни трябва да бъде 22 °C (с приблизително отклонение ± 3 °C). Относителната влажност следва да бъде най-малко 30 % и е препоръчително тя да не надвишава 70 % освен по време на почистване на помещението. Целта следва да бъде относителна влажност 50—60 %. Осветлението трябва да бъде изкуствено. Ежедневната последователност при осветлението трябва да е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина.
20. Лабораторна храна и питейна вода трябва да се предоставят *ad libitum*. Млади полово зрели животни могат да бъдат отглеждани в индивидуални клетки или да се разпределят в група до три животни в клетка. Поради младата възраст на незрелите животни, за тях се препоръчва отглеждане на групи в общи клетки.
21. За високите нива на фитоестрогени в лабораторни храни е известно, че увеличават теглото на матката при гризачи в степен, достатъчна, за да попречи на утеротрофичното биологично изследване (13)(14)(15). Високите нива на фитоестрогени и енергия от обмяна на веществата в лабораторни храни могат също така да доведат до ранен пубертет, ако се използват незрели животни. Наличието на фитоестрогени произтича основно от включването на продукти от соя и люцерна в лабораторните храни и е доказано, че концентрациите на фитоестрогени варират от една партида стандартни лабораторни храни към друга (23). Телесното тегло е важна променлива, тъй като количеството на консумираната храна е свързано с телесно тегло. Следователно действителната доза фитоестрогени, консумирана по същия хранителен режим, може да варира при различните видове и според възрастта (9). При незрели женски плъхове консумацията на храна на телесно тегло може да е приблизително два пъти по-висока от тази при овариетомизирани млади полово зрели женски животни. При млади полово зрели мишки консумацията на храна на телесно тегло може да е приблизително четири пъти по-висока от тази при овариетомизирани млади полово зрели женски плъхове.
22. Резултатите от утеротрофичното биологично изследване (9)(17)(18)(19) обаче сочат, че ограничени количества на фитоестрогени в хранителния режим са приемливи и не намаляват чувствителността на биологичното изследване. Като насока, равнищата на фитоестрогени в хранителния режим не следва да надвишават 350 μg еквивалент на генистеин на грам лабораторни храни за незрели женски плъхове от породите Sprague Dawley и Wistar (6)(9). Такива хранителни режими също трябва да са подходящи, когато се изпитват овариетомизирани млади полово зрели плъхове, тъй като консумацията на храна на телесно тегло е по-малка при младите полово зрели животни в сравнение с незрелите животни. Ако трябва да бъдат използвани овариетомизирани полово зрели мишки или по-чувствителни към фитоестрогени плъхове, следва да бъде взето предвид пропорционално намаление на нивата на фитоестрогени в хранителния режим (20). Освен това, различията в наличната енергия от обмяната на веществата при различните хранителни режими може да доведе до измествания на началото на пубертета във времето (21)(22).

▼ **M5**

23. Преди проучването се изисква внимателен подбор на хранителен режим без повишени нива на фитоестрогени (за насоки вж. (6)(9)) или енергия от обмяна на веществата, които могат да доведат до невъзможност за разграничаване на резултатите (15)(17)(19)(22)(36). За гарантиране на правилното изпълнение на използваната от лабораторията система за изпитване, както е посочено в параграфи 26 и 27, е важно да бъде извършена проверка на тези два фактора. Като предпазна мярка в съответствие с добрата лабораторна практика (ДЛП), следва да бъдат вземани представителни проби от всяка партида храни, дадени по време на изследването, за евентуален анализ за съдържание на фитоестрогени (напр. в случай на висока стойност на теглото на матката в сравнение с контролни данни от предходни периоди, или на неадекватен отговор на референтния естроген, 17 α -етинилестрадиол). Като част от проучването трябва да бъдат анализирани аликвотни части, или същите да бъдат замразени при температура — 20 °C или по такъв начин, че да се предотврати разлагане на пробата преди анализа.
24. Някои материали за постилане могат да съдържат срещани в природата естрогенни или антиестрогенни химикали (напр. за царевичните кочани е известно, че засягат цикъла при плъхове и изглежда, че имат антиестрогенно действие). Избраният материал за постилане трябва да съдържа минимално ниво на фитоестрогени.

Подготовка на животните

25. Опитни животни без видими признаци на заболяване или физически отклонения се разпределят на случаен принцип в контролните и третиранияте групи. Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. Животните трябва да бъдат индивидуално идентифицирани. За предпочитане е незрелите животни да бъдат поставяни в клетки с майки или приемни майки до отбиване по време на аклиматизацията. Периодът на аклиматизация преди началото на изследването следва да е около 5 дни за млади полово зрели животни и за незрели животни, доставени с майки или приемни майки. Ако незряло животно е получено като отбито без майка, може да е необходимо по-кратка продължителност на периода на аклиматизация, тъй като дозирането трябва да започне веднага след отбиването (вж. параграф 29).

ПРОЦЕДУРА**Проверка на пригодността на лабораторията**

26. Могат да бъдат използвани два различни варианта за проверка на пригодността на лабораторията:
- Периодична проверка, основаваща се на изследване с положителна контрола и изходна стойност (вж. параграф 27). Поне веднъж на всеки 6 месеца и всеки път, когато има промяна, която може да повлияе на провеждането на изследването (например нова рецептура за хранителния режим, промяна в персонала, отговорен за извършването на дисекцията, промяна на породата на животните или на доставчика и др.), реагирането на системата на изпитване (животински модел) следва да бъде проверено, като се използва подходяща доза (основаваща се на изследването с положителна контрола и изходна стойност, описано в параграф 27) на референтен естроген: 17 α -етинилестрадиол (CAS № 57-63-6) (EE).
 - Използване на паралелни контроли чрез включване на група, третирана с подходяща доза от референтен естроген във всяко изследване.

Ако системата не отговаря според очакванията, условията на опита трябва да бъдат проверени и съответно изменени. Препоръчва се дозата от референтния естроген, която ще се използва и при двата подхода, да бъде приблизително ED70—ED80.

▼ M5

27. **Изследване с положителна контрола и изходна стойност** — преди дадена лаборатория да проведе за първи път изследване съгласно настоящия метод за изпитване, пригодността на лабораторията следва да бъде доказана чрез изпитване на реагирането на животинския модел чрез установяване на зависимостта доза-отговор по отношение на референтен естроген: 17 α -етинилестрадиол (CAS № 57-63-6) (EE) с най-малко четири дози. Отговорът, изразяващ се в теглото на матката, ще бъде сравнен с установените данни за минали периоди (вж. позоваване (5)). Ако това изследване с положителна контрола и изходна стойност не даде очакваните резултати, условията на опита трябва да бъдат проверени и изменени.

Брой и състояние на животните

28. Всяка третирана и всяка контролна група трябва да включва поне 6 животни (за протоколи от методите с незрели и с овариектомизирани полово зрели животни).

Възраст на незрелите животни

29. За утеротрофичното биологично изследване с незрели животни следва да бъде определен денят на раждане. Дозирането трябва да започне достатъчно рано, за да се гарантира, че в края на прилагането на изпитвания химикал физиологичното увеличение на ендогенните естрогени, свързано с пубертета, все още не е настъпило. От друга страна, съществуват доказателства, че много младите животни могат да бъдат по-малко чувствителни. За определяне на оптималната възраст всяка лаборатория трябва да вземе предвид свои собствени съпътстващи данни относно съзряването.

Като обща насока, дозирането при плъховете може да започне незабавно след ранното отбиване през постнатален ден 18 (като денят на раждането се счита за постнатален ден 0). За предпочитане е дозирането при плъхове да бъде приключено през постнатален ден 21 и във всички случаи преди постнатален ден 25, тъй като след тази възраст хипоталамус-хипофиза-гонадната ос започва да функционира и нивата на ендогенния естроген може да започнат да нарастват със съпътстващо увеличение на средните стойности на теглото на матката и увеличение на стандартните отклонения за групата (2)(3)(10)(11)(12).

Процедура за овариектомия

30. При овариектомизираните женски плъхове и мишки (третиран и контролни групи) овариектомията трябва да се извърши във възраст между 6 и 8 седмици. За плъхове трябва да изминат минимум 14 дни между овариектомията и първия ден на прилагането, за да се даде възможност на матката да достигне стабилно минимално изходно тегло. За мишки трябва да изминат минимум 7 дни между овариектомията и първия ден на прилагането. Тъй като малки количества овариална тъкан са достатъчни за производството на значителни нива на циркулиращи естрогени (3), животните трябва да бъдат изпитани, преди да бъдат използвани, чрез наблюдение на епителиални клетки, взети с тампон от влаглището, в продължение най-малко на пет последователни дни (напр. дни 10—14 след овариектомията при плъхове). Ако при животните има показания за навлизане в еструс, животните не трябва да се използват. По-нататък, по време на аутопсията, местата на срезове на яйчниците следва да бъдат изследвани за наличие на овариална тъкан. При наличие, животното не трябва да се използва при изчисленията (3).
31. Процедурата по овариектомия започва с животното, лежащо по корем, след като е било правилно анестезирано. Инцизията за отваряне на задностранната коремна стена следва да бъде с дължина приблизително 1 cm надлъжно по средата между долния ръб на ребрата и хълбочния гребен, и няколко милиметра странично от страничния ръб на поясния мускул. Яйчникът трябва да се извади от коремната кухина върху асептично поле. Яйчникът следва да бъде отстранен при свързването на яйцепровода с тялото на матката. След потвърждаване, че не се наблюдава силно кръвотечение, коремната стена трябва да бъде затворена с хирургичен шев и кожата трябва да бъде затворена с автоматични скоби (autoclips) или подходящ хирургичен шев. Точките на лигатурата са представени схематично на фигура 1. Следва да се използва подходящо постоперативно обезболяване, както е препоръчано от ветеринар с опит при грижите за гризачи.

▼ M5

Телесно тегло

32. При метода с овариектомизирани полово зрели животни телесното тегло и теглото на матката не са взаимосвързани, тъй като теглото на матката се влияе от хормони като естрогените, но не и от фактори на растежа, които регулират размерите на тялото. Обратно, при модела с незрели животни телесното тегло е свързано с теглото на матката, докато животното съзрява (34). Следователно в началото на изследването вариациите в теглото на животните, използвани при модела с незрели животни, следва да са минимални и да не превишават $\pm 20\%$ от средното тегло. Това означава, че големината на котилото следва да бъде стандартизирана от снабдителя, за да се гарантира, че поколението от различни майки ще бъде хранено приблизително по еднакъв начин. Животните трябва да бъдат разпределени към групи (както контролни, така и третиранни) чрез случайно разпределение по тегло, така че средното телесно тегло във всяка група да не е статистически различно от това в която и да е друга група. Следва да се обърне внимание, за да се избегне разпределяне на животни от едно котило към същата третирана група, доколкото това е практически възможно, без да се увеличава броят на котилата, които да се използват за проучването.

Дозиране

33. С цел да се установи дали даден изпитван химикал може да има естрогенно действие *in vivo*, обичайно са достатъчни две групи с определена доза и една контролна и затова тази постановка е предпочитана от съображения за хуманно отношение към животните. Ако целта е да се получи крива доза-отговор или да се екстраполира към пониски дози, необходими са най-малко 3 групи с определена доза. Ако се изисква информация извън тази за естрогенната активност (като например оценка на ефикасността), трябва да бъде взета под внимание отделна схема на дозиране. С изключение на третиране с изпитвания химикал, животните в контролната група трябва да бъдат отглеждани по идентичен начин на този при животните от изпитваната група. Ако се използва носител при прилагането на изпитвания химикал, контролната група трябва да получава същото количество носител, което се използва при третираните групи (или най-високият обем, използван при третираните групи, ако обемът е различен при различните групи).
34. Целта в случая на утеротрофичното биологично изследване е да се изберат дози, които гарантират оцеляването на животните, и които са без значителна токсичност или дистрес за животните след три последователни дни на прилагане на химикала до максимална доза от 1 000 mg/kg/ден. Всички нива на доза следва да се предлагат и подбират, като се имат предвид всички достъпни токсикологични и токсикокинетични данни за изпитвания химикал или за свързани с него материали. За най-високото ниво на доза следва първо да се вземе под внимание стойността на LD50 и/или информацията за остра токсичност с цел да се избегне смърт, силно страдание или дистрес при животните (24)(25)(26). Най-високата доза следва да представлява максималната допустима доза (МДД); изследване, проведено при ниво на доза, предизвикало положителен утеротрофичен отговор, също би било прието. Като скрининг, големи интервали (напр. половин логаритмична единица, отговаряща на кратност на дозата, равна на 3,2, или дори до една логаритмична единица) между дозиранията са общоприемливи. Ако няма достъпни подходящи данни, може да се проведе изследване за определяне на обхвата, което да подпомогне определянето на използваните дози.
35. Като алтернатива, ако естрогенната ефикасност на даден агонист може да бъде оценена от данни *in vitro* (или *in silico*), тези данни могат да бъдат взети под внимание при избора на доза. Например, количеството на изпитвания химикал, който би произвел утеротрофичен отговор, който да е равностоен на референтния агонист (етинилестрадиол) се оценява по неговата относителна ефикасност *in vitro* по отношение на етинилестрадиол. Най-високата доза на изпитване ще бъде приложена като кратна на тази равностойна доза с кратност напр. 10 или 100.

▼ M5

Съображения при определянето на обхвата

36. Ако е необходимо, може да се извърши предварително изследване за определяне на обхвата, с малко на брой животни. В това отношение, Ръководство на ОИСР № 19 (25) може да се използва за определяне на клиничните признаци, които показват токсичност или дистрес за животните. Ако е осъществимо в рамките на това изследване за определяне на обхвата след три дни от прилагането, матките могат да бъдат изрязани и претеглени приблизително 24 часа след последната доза. Тези данни биха могли да се използват след това за подпомагане при планирането на основното изследване (за избор на приемлива максимална и по-ниски дози, и за препоръка относно броя на групите с определена доза).

Прилагане на дозите

37. Изпитваният химикал се прилага по орален път през сонда или чрез подкожно инжектиране. При избора на пътя на прилагане следва да бъдат взети под внимание съображенията за хуманно отношение към животните, както и токсикологичните аспекти, като например относителност към пътя на експозиция на химикала при хора (напр. относителност на орален път през сонда към експозиция чрез поглъщане, или на подкожно инжектиране към вдишване или към дермална адсорбция), физичните/химични свойства на изпитвания материал и особено съществуващата токсикологична информация и данни за метаболизма и кинетиката (напр. необходимост да се избегне ефектът на първото преминаване, по-добра ефикасност чрез конкретен път).
38. Препоръчва се, винаги когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на воден разтвор/суспензия. Но тъй като повечето естрогенни лиганди или техните метаболитни прекурсори са хидрофобни, най-често използваният подход е използване на разтвор/суспензия в масло (напр. царевично, фъстъчено, сусамово или маслиново масло). Тези масла обаче имат различно съдържание на калории и на мазнини, като с това носителят може да засегне общия прием на енергия от обмяната на веществата, като по този начин потенциално се променят измерените крайни точки, като теглото на матката, особено при метода с незрели животни (33). Затова, преди изследването всеки носител, който ще бъде използван, следва да се изпита върху контроли без носители. Изпитваните химикали могат да бъдат разтворени в минимално количество 95 % етанол или други подходящи разтворители, и разреждени до окончателните работни концентрации в изпитвания носител. Токсичните характеристики на разтворителя трябва да бъдат известни и следва да се изпитат в отделна контролна група само на разтворител. Ако изпитваният химикал се счита за стабилен, може да се използва слабо нагряване и енергично механично действие за подпомагане на разтварянето на изпитвания химикал. Трябва да бъде определена стабилността на изпитвания химикал в носител. Ако изпитваният химикал е стабилен за периода на изследването, тогава може да бъде приготвена една начална аликвотна част от изпитвания химикал, и определените разреждания на дозата да се приготвят всеки ден.
39. Графикът за дозиране ще зависи от използвания модел (вж. параграф 29 за модела с незрели животни и параграф 30 за модела с овариетомизирани полови зрели животни). Незрелите женски плъхове се дозират с изпитвания химикал ежедневно в продължение на три последователни дни. Триденно третиране се препоръчва и за овариетомизирани женски плъхове, но по-продължителната експозиция е приемлива и може да доведе до подобро откриване на слабо активни химикали. При овариетомизирани женски мишки продължителност на прилагане от 3 дни следва да е достатъчна, без да има значително предимство при удължаване на срока до седем дни за силни естрогенни агонисти, но тази връзка не е доказана за слаби естрогени в изследването за валидиране (16) и следователно дозирането при овариетомизирани полови зрели мишки следва да бъде удължено до 7 последователни дни. Дозата следва да се дава по едно и също време всеки ден. Те трябва да бъдат коригирани, колкото е необходимо, за да се поддържа постоянно ниво на доза на телесно тегло на животното (напр. mg изпитван химикал на kg телесно тегло на ден). По отношение на изпитвания обем, неговото вариране на основа телесно тегло следва да се сведе до минимум чрез регулиране на концентрацията на дозиран разтвор с цел да се осигури постоянен обем на основа телесно тегло на всички нива на доза и за всеки път на прилагане.

▼ M5

40. Когато изпитваният химикал се прилага чрез хранене през сонда, това следва да става чрез еднократна дневна 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. Следва да се спазват местните насоки за грижи за животните, но обемът не следва да превишава 5 ml/kg телесно тегло, освен в случай на водни разтвори, където могат да бъдат използвани 10 ml/kg телесно тегло.
41. Когато изпитваният химикал се прилага чрез подкожно инжектиране, това следва да се прави с една дневна доза. В дорзално-скапуларната или поясната област дозите трябва да се прилагат посредством стерилна игла (напр. 23G или 25G) и туберкулинова спринцовка. Бръсненето на мястото на инжектиране е по избор. Всякакви загуби, изтичане на мястото на инжектиране или непълно дозиране трябва да бъдат записвани. Общото количество инжектиран обем на плъх на ден не трябва да надхвърля 5 ml/kg телесно тегло, разделени на 2 места на инжектиране, освен в случаите, когато се прилагат водни разтвори, при които могат да бъдат използвани 10 ml на kg телесно тегло.

Наблюдения*Общи и клинични наблюдения*

42. Общи клинични наблюдения следва да бъдат извършвани поне един път дневно и по-често, когато се наблюдават признаци на токсичност. Наблюденията следва да се извършват за предпочитане по едно и също време всеки ден и като се има предвид върховият период на предвидените ефекти след получаване на дозата. Всички животни следва да бъдат наблюдавани за смъртност, заболяемост и общи клинични признаци като промяна в поведението, кожата, козината, очите, мукозните мембрани, поява на секречия и екскречия, както и автономна активност (напр. сълзене, пилоерекция, промяна в големината на зениците, необичаен начин на дишане).

Телесно тегло и консумация на храна

43. Всички животни трябва да бъдат претегляни дневно с точност до 0,1 g, като се започне точно преди започване на третирането, т.е., когато животните се разпределят на групи. Като незадължително измерване, количеството на консумираната храна през периода на третиране може да бъде измерено за отделната клетка чрез претегляне на хранилката. Резултатите за консумацията на храна следва да бъдат изразени в грамове на плъх дневно.

Дисекция и измерване на теглото на матката

44. Двадесет и четири часа след последното третиране плъховете се умъртвяват по хуманен начин. В идеалния случай аутопсията се извършва на случаен принцип между различните групи, за да се избегне поставянето на дадена група на първо или последно място, което може леко да повлияе на данните. Целта на биологичното изследване е да се измери теглото на матката както в мокро състояние, така и след изсушаване. Мокрото тегло включва матката и съдържанието на луминална течност. Теглото след изсушаване се изчислява след като съдържанието луминална течност в матката бъде изразено и отстранено.
45. Преди дисекцията при незрели животни се преглежда състоянието на отвора на вагината. Процедурата по дисекцията започва с отварянето на коремната стена, като се започне при лонното съчленение. След това рогът на матката и яйчниците, ако са налични, се отделят от дорзалната коремна стена. Пикочният мехур и уретерите се отстраняват от вентралната и страничната страна на матката и влагалището. Влакнестите сраствания между ректума и влагалището се отделят, докато бъде идентифицирана точката на свързване на отвора на влагалището и кожата на перинеума. Матката и влагалището се отделят от тялото чрез инцизия на стената на влагалището малко над точката на свързване с кожата на перинеума, както е показано на фигура 2. Матката следва да бъде отделена от тялото чрез леко срязване на маточния мезентерий в мястото на закрепване по цялата дължина на дорзолатералния аспект на всеки рог на матката. След като матката бъде извадена от тялото,

▼ **M5**

- нейната обработка трябва да бъде достатъчно бърза, за да се избегне изсушаване на тъканите. Загубата на тегло поради изсушаване става по-значима при малки тъкани като матката (23). Ако яйчниците са налични, те се отстраняват при яйцепровода, като се избягва загубата на луминална течност от рога на матката. Ако животното е било овари-ектомизирано, местата на срезове следва да бъдат изследвани за наличие на овариална тъкан. Излишната мазнина и съединителна тъкан трябва да се почисти. Влагалището се отстранява от матката точно под шийката на матката, така че шийката на матката остава с тялото на матката, както е показано на фигура 2.
46. Всяка матка следва да бъде прехвърлена в индивидуално маркиран и претеглен съд (напр. блюдо „Петри“ или пластмасово тегловно блюдо) внимателно, за да се избегне изсушаване преди претеглянето (напр. в контейнера може да бъде поставена филтърна хартия, леко напоена с физиологичен разтвор). Матката с луминалната течност се претегля с точност до 0,1 mg (мокро тегло на матката).
47. След това всяка матка се обработва индивидуално за отстраняване на луминалната течност. И двата рога на матката се пробиват или срязват надлъжно. Матката се поставя върху леко овлажнена филтърна хартия (например Уотман № 3) и леко се притиска с втора леко овлажнена филтърна хартия за цялостно премахване на луминалната течност. Матката без луминалната течност се претегля с точност до 0,1 mg (тегло на матката в изсушено състояние).
48. Теглото на матката при прекратяване може да бъде използвано, за да се гарантира, че не е била превишена подходящата възраст на невредимия незрял плъх, но въпреки това данните от минали периоди за породата плъхове, използвана от лабораторията, са от решаващо значение в това отношение (вж. параграф 56 за тълкуване на резултатите).

Незадължителни изследвания

49. След претеглянето матката може да се фиксира в 10 % неутрален буферирани формалинов разтвор, за хистопатологично изследване след оцветяване с хематоксилин и еозин. Влагалището може да бъде съответно изследвано (вж. параграф 9). В допълнение може да бъде направено морфометрично измерване на ендометриалния епител за количествено сравнение.

ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ**Данни**

50. Данните от изследването следва да включват:
- броя на животните в началото на изпитването,
 - броя и идентичността на намерените мъртви животни по време на изследването или умъртвени по хуманни съображения, както и датата и часа на всяка смърт или умъртвяване на животните по хуманен начин,
 - броя и идентичността на животните, показващи признаци на токсичност, и описание на наблюдаваните признаци на токсичност, включително времето им на настъпване, продължителността и силата на всички токсични ефекти, и
 - броя и идентичността на животните, които показват всякакви увреждания, и описание на типа на уврежданията.

▼ M5

51. Индивидуалните данни за животните следва да се регистрират за телесното тегло, мокрото тегло на матката и теглото на матката в изсушено състояние. Следва да се използват статистически анализи с едностранна критична област за агонисти, за да се определи дали прилагането на изпитван химикал е довело до статистически значимо ($p < 0,05$) увеличаване на теглото на матката. Следва да се извършат подходящи статистически анализи, за да се изследват свързаните с третирането изменения в теглото на матката в изсушено състояние и в мокрото тегло на матката. Например, данните могат да бъдат оценени чрез подход с ковариационен анализ (ANCOVA) с телесното тегло при аутопсия като ковариант. Преди анализа на данните, върху данните за матката може да бъде направена логаритмична трансформация за стабилизиране на дисперсията. Изпитването на Dunnett и Hsu е подходящо за сравнения по двойки на групите с определена доза с контролите на носител, и за изчисляване на доверителни интервали. Графики на стандартизирани остатъци могат да се използват за откриване на евентуални стойности, силно различаващи се от нормалните, и за оценка на хомогенността на дисперсиите. Тези процедури бяха приложени в програмата на ОИСП за валидиране, с използване на PROC GLM в SAS (Statistical Analysis System) (SAS Institute, Cary, NC), версия 8 (6)(7).

52. Заключителният доклад включва:

Извършваща изпитвания лаборатория:

- Отговорен персонал и неговите отговорности, свързани с обучението
- Данни от изпитването с положителна контрола и референтна стойност и периодични данни от положителни контроли (вж. параграфи 26 и 27)

Изпитван химикал:

- Характеризиране на изпитваните химикали
- Физична природа и, където е относимо, физични и химични свойства
- Метод и честота на изготвяне на разрежданията
- Всички събрани данни за стабилност
- Всички анализи на разтворите за дозиране

Носител:

- Характеризиране на изпитвания носител (естество, доставчик и партида)
- Обосновка за избора на носител (когато носителят е различен от вода).

Изпитвани животни:

- Вид и порода и обосновка за техния избор
- Доставчик и специални съоръжения на доставчика
- Възраст при доставката, с дата на раждане
- За незрели животни — дали е доставено с майка или приемна майка, и дата на отбиване
- Подробни данни за процедурата за аклиматизация на животното
- Брой животни в клетка
- Подробности и метод за индивидуална и групов идентификация на животните

Условия на изследването:

- Подробности относно процеса на случаен подбор (т.е. използван метод)
- Обосновка на избора на доза;

▼ M5

- Подробности за това в какъв вид е изпитваният химикал и какви са достигнатите концентрации, стабилност и хомогенност на този химикал
- Подробности за прилагането на изпитвания химикал и обосновка за избора на път на експозиция
- Хранителен режим (наименование, вид, доставчик, съдържание и, ако са известни, нива на фитоестрогени)
- Източник на вода (напр. чешмяна вода или филтрувана вода) и доставка (чрез тръби от голям контейнер, в бутилки и т.н.)
- Материал за постилане (наименование, вид, доставчик, съдържание)
- Регистриране на условията за поставяне в клетки, интервала на осветление, температурата и влажността в помещението, почистването на помещението
- Подробно описание на аутопсията и процедурите за претегляне на матката
- Описание на статистическите процедури

*Резултати**За отделните животни:*

- Всички дневни индивидуални телесни тегла (от разпределението по групи до аутопсията) (с точност до 0,1 g)
- Възраст на всяко животно (в дни, като денят на раждане се счита за ден 0), на която започва прилагането на изпитвания химикал
- Дата и час на прилагане на всяка доза
- Изчислен обем и приложена доза и наблюдения относно всякакви загуби по време на прилагането или след него
- Ежедневно регистриране на състоянието на животното, включително относимите симптоми и наблюдения
- Предполагаема причина за смъртта (ако по време на изследването е намерено в терминално състояние или мъртво)
- Дата и час на умъртвяването по хуманен начин с интервал от време от последното прилагане на доза
- Мокро тегло на матката (с точност до 0,1 mg) и всякакви наблюдения относно загуба на луминална течност по време на дисекцията и подготовката за претегляне
- Тегло на матката в изсушено състояние (с точност до 0,1 mg)

За всяка група животни:

- Средно дневно телесно тегло (с точност до 0,1 g) и стандартни отклонения (от разпределението по групи до аутопсията)
- Средни тегла на матката в мокро и изсушено състояние (с точност до 0,1 mg) и стандартни отклонения
- Дневна консумация на храна, ако е измерена (изчислена в грамове консумирана храна на животно)

▼ M5

- Резултатите от статистическите анализи, сравняващи теглата на матката при третираните групи както в мокро, така и в изсушено състояние, спрямо същите измервания в контролните групи на носител.
- Резултатите от статистическите анализи, сравняващи общото телесно тегло и наддаването на тегло при третираните групи спрямо същите измервания в контролните групи на носител.

53. Обобщение на важните насочващи факти от метода за изпитване

	Плъхове	Мишки
Животни		
Порода	Обичайно използвана лабораторна порода гризачи	
Брой животни	Най-малко 6 животни в група с определена доза	
Брой на групите	Най-малко 2 групи за изпитване (вж. параграф 33 за насоки) и отрицателна контролна група За насоки относно положителните контролни групи вж. параграфи 26 и 27	
Условия на отглеждане и хранене		
Т° в помещението с животните	22 °C ± 3 °C	
Относителна влажност	50—60 %, но не под 30 % или над 70 %	
Ежедневна последователност при осветлението	12 часа светлина, 12 часа тъмнина	
Хранителен режим и питейна вода	Ad libitum	
Отглеждане	Индивидуално или в група до три животни (за незрелите животни се препоръчва отглеждане на групи в общи клетки)	
Хранителен режим и материал за постилане	Препоръчва се ниско ниво на фитоестрогени в хранителния режим и материала за постилане	
Протокол		
Метод	Метод с незрели неовариетомизирани животни (предпочитаният метод). Метод с овариетомизирани полови зрели женски животни	Метод с овариетомизирани полови зрели женски животни
Възраст при дозиране на незрелите животни	ПНД 18 най-рано. Дозирането трябва да бъде приключено преди ПНД 25	Не е относимо в рамките на обхвата на настоящия метод за изпитване.
Възраст при овариетомията	Възраст между 6 и 8 седмици.	
Възраст при дозирането за овариетомизирани животни	Най-малко 14 дни следва да са изтекли от овариетомията до 1-я ден от прилагането.	Най-малко 7 дни следва да са изтекли от овариетомията до 1-я ден от прилагането.
Телесно тегло	Варирането на телесното тегло следва да бъде минимално и да не превишава ± 20 % от средното тегло.	

▼ M5

	Плъхове	Мишки
Дозиране		
Път на прилагане	Орален път през сонда или подкожно инжектиране	
Честота на прилагане	Еднократна дневна доза	
Обем за прилагане през сонда или подкожно инжектиране	≤ 5ml/kg телесно тегло (или до 10 ml/kg телесно тегло в случай на водни разтвори) (на 2 места на инжектиране при подкожно инжектиране)	
Продължителност на прилагането	3 последователни дни при модела с незрели животни Най-малко 3 последователни дни при модела с овариетомизирани животни	7 последователни дни при модела с овариетомизирани животни
Час на аутопсията	Около 24 часа след последната доза	
Резултати		
Положителен отговор	Статистически значимо нарастване на средното тегло на матката (в мокро и/или изсушено състояние)	
Референтен естроген	17α-етинилестрадиол	

НАСОКИ ЗА ТЪЛКУВАНЕТО И ПРИЕМАНЕТО НА РЕЗУЛТАТИТЕ

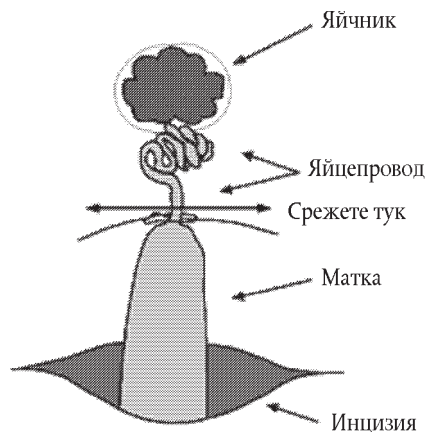
54. По принцип изпитването за естрогенност следва да се счита за положително, ако се наблюдава статистически значимо увеличаване на теглото на матката ($p < 0,05$) най-малко при високото ниво на доза в сравнение с контролната група на разтворител. Положителният резултат се подкрепя допълнително от доказване на биологически реалистична връзка между дозата и степента на отговора, като се има предвид, че припокриването на естрогенната и антиестрогенната активност на изпитвания химикал могат да повлияят на формата на кривата доза-отговор.
55. Трябва да се вземат мерки, за да не се превишава максималната допустима доза, за да се даде възможност за съдържателно тълкуване на данните. Намалването на телесното тегло, клиничните признаци и други находки следва да бъдат подробно оценени в това отношение.
56. Важно съображение за приемането на данните от утеротрофичното биологично изследване са теглата на матката на животните от контролната група на носител. Високите контролни стойности могат да поставят под съмнение реагирането на биологичното изследване и способността да открива много слаби естрогенни агонисти. Прегледът на специализираната литература и данните, получени по време на валидирането на утеротрофичното биологично изследване, насочват, че случаи на високи средни контролни стойности се появяват спонтанно, особено при незрели животни (2)(3)(6)(9). Категорична горна граница за теглото на матката не може да бъде дадена, тъй като теглото на матката при незрели плъхове зависи от много променливи, като например породата или телесното тегло. Като насока, ако теглото на матката при контролни незрели плъхове е между 40 и 45 mg, резултатите следва да се считат за съмнителни, а тегло на матката над 45 mg може да доведе до повторно независимо провеждане на изпитването. Това обаче трябва да се разглежда за всеки отделен случай (3)(6)(8). При изпитвания върху възрастни плъхове при всяка непълна овариетомия остава овариална тъкан, която може да произвежда ендогенен естроген и да забави намаляването на теглото на матката.

▼ M5

57. Тегло на матката в изсушено състояние при контроли на носител от под 0,09 % от телесното тегло за незрели женски плъхове и от по-малко от 0,04 % за овариетомизирани млади полово зрели женски животни изглежда дава приемливи резултати [вж. таблица 31 (2)]. Ако контролните тегла на матката са по-големи от тези стойности, трябва да се проучат внимателно различни фактори, включително възрастта на животните, правилната овариетомия, фитоестрогените в хранителния режим и т.н., и евентуален отрицателен резултат от изследването (липса на показания за естрогенна активност) трябва да се използва предпазливо.
58. Данните за минали периоди за контролните групи на носител следва да бъдат запазени в лабораторията. Данните за минали периоди за отговор на положителни референтни естрогени, като 17 α -етинилестрадиол, също следва да бъдат запазени в лабораторията. Лабораториите могат също да изпитват отговора на известни слаби естрогенни агонисти. Всички тези данни могат да бъдат сравнявани с наличните данни (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8), за да се гарантира, че методите на лабораторията притежават достатъчна чувствителност.
59. Теглата на матката в изсушено състояние са показали по-малко вариране от тези в мокро състояние в хода изследването на ОИСП за валидиране (6)(7). Независимо от това, значителен отговор в което и да е от тези две измервания е показание, че изпитваният химикал има положителна естрогенна активност.
60. Произходът на утеротрофичния отговор не е изцяло естрогенен, обаче положителният резултат при утеротрофичното биологично изследване по принцип следва да се тълкува като доказателство за естрогенен потенциал *in vivo* и обичайно следва да води до предприемане на действия за допълнително изясняване (вж. параграф 9 и „Концептуалната рамка на ОИСП за изпитване и оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система“ (допълнение 2).

Фигура 1

Схематична диаграма, показваща хирургично отстраняване на яйчниците

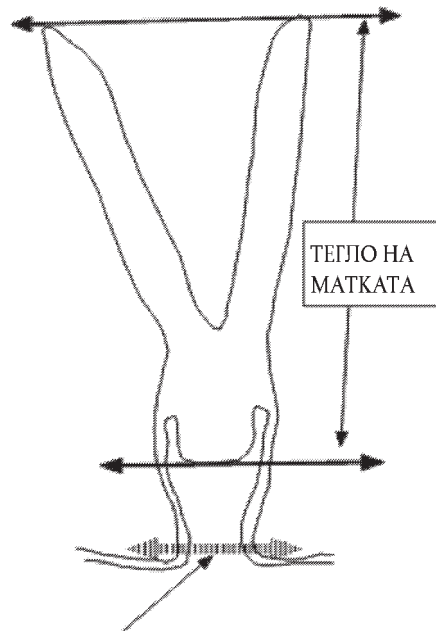


Мезометриумът, васкулатурата и мастното тяло не са показани

Процедурата започва с отваряне на задностранната коремна стена по средата между долния ръб на ребрата и хълбочния гребен, и няколко милиметра странично от страничния ръб на поясния мускул. Яйчниците следва да бъдат локализиран в рамките на коремната кухина. След това яйчниците се отделят физически от коремната кухина върху асептично поле, поставя се лигатура между яйчника и матката за овладяване на кръвенето и яйчникът се отстранява чрез инцизия над лигатурата при свързването на яйцепровода с всеки рог на матката. След потвърждаване, че не се запазва значително кръвотечение, коремната стена трябва да бъде затворена с хирургичен шев и кожата трябва да бъде затворена, например с автоматични скоби (autoclips) или хирургичен шев. На животните следва да се даде възможност да се възстановят и теглото на матката да намалее през период най-малко 14 дни преди използването.

▼ M5

Фигура 2

**Отстраняване и подготовка на маточните тъкани за измерване на
теглото**

Линия на прекъсване при аутопсия

Процедурата започва с отварянето на коремната стена при лонното съчленение. След това всеки яйчник, ако е наличен, и рогът на матката, се отделят от дорзалната коремна стена. Пикочният мехур и уретерите се отстраняват от вентралната и страничната страна на матката и влагалището. Влакнестите сраствания между ректума и влагалището се отделят, докато бъде идентифицирана точката на свързване на отвора на влагалището и кожата на перинеума. Матката и влагалището се отделят от тялото чрез инцизия на стената на влагалището малко над точката на свързване с кожата на перинеума, както е показано на фигурата. Матката следва да бъде отделена от тялото чрез леко срязване на маточния мезентерий в мястото на закрепване по цялата дължина на дорзолатералния аспект на всеки рог на матката. След отстраняването от тялото излишната мазнина и съединителна тъкан се почистват. Ако яйчниците са налични, те се отстраняват при яйцепровода, като се избягва загубата на луминална течност от рога на матката. Ако животното е било овариектомизирано, местата на срезове следва да бъдат изследвани за наличие на овариална тъкан. Влагалището се отстранява от матката точно под шийката на матката, така че шийката на матката остава с тялото на матката, както е показано на фигурата. След това матката може да бъде претеглена.

▼ M5*Допълнение 1*

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Антиестрогенност е способността на даден химикал да потиска активността на 17 β -естрадиол в организъм на бозайник.

Химикал означава вещество или смес.

Дата на раждане е постнатален ден 0.

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

Доза е прилаганото количество от изпитвания химикал. При утеротрофичното биологично изследване дозата се изразява като маса на изпитвания химикал за единица телесно тегло на изпитваното животно на ден (напр. mg на kg телесно тегло дневно).

Максимална допустима доза (МДД) е най-голямото количество от даден химикал, което, при въвеждане в тялото, не умъртвява изпитваните животни (обозначава се с LD₀) (IUPAC, 1993)

Естрогенност е способността на даден химикал да действа като 17 β -естрадиол в организъм на бозайник.

Постнатален ден X е X-тият поред ден на живот след датата на раждане.

Чувствителност е относителният дял на всички положителни/активни химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на метод за изпитване, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на приложимостта на метода за изпитване.

Специфичност е относителният дял на всички отрицателни/неактивни химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на метода за изпитване, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на приложимостта на метода за изпитване.

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

Утеротрофичен е термин, използван за описване на положителното влияние върху растежа на тъканите на матката.

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

Допълнение 2

Бележка: Документ, изготвен от Секретариата на програмата относно насоките за изпитване въз основа на споразумението, постигнато на 6-тото заседание на Оперативната група по изпитване и оценка на нарушителната функция на ендокринната система

Концептуална рамка на ОИСП за изпитване и оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система

<p>Равнище 1 Сортиране и приоритизиране върху съществуваща информация</p>	<ul style="list-style-type: none"> — физични и химични свойства, напр. ММ, реактивоспособност, летливост, биоразградимост — експозиция на човека и окол. среда, напр. обем на производство, изпускания, употреби — опасност, напр. токсикологични данни на разположение 	
<p>Равнище 2 Изпитвания <i>in vitro</i> предоставящи механистични данни</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Афинитет за свързване към рецептор ER, AR, TR — Транскрипционно активиране — Ароматаза и стероидогенеза <i>in vitro</i> — Разпознаване/свързване към рецептор за арилов въглерод. — QSAR 	<ul style="list-style-type: none"> — прескрининг висока производителност — функция на щитовидната жлеза — изследвана хепатоцити от риби (VTG) — други (както е приложимо)
<p>Равнище 3 Изпитвания <i>in vivo</i> предоставящи данни за отделни ендокринни механизми и ефекти</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Утеротрофично изследване (за естрогени) — Изследване на Hershberger (за андрогени) — Хормонална функция, несвързана с хормони — Други (напр. щитовидна жлеза) 	<ul style="list-style-type: none"> — изсл. на VTG (вителогенин) от риби (за естрогени)
<p>Равнище 4 Изпитвания <i>in vivo</i> предоставящи данни за множество ендокринни механизми и ефекти</p>	<ul style="list-style-type: none"> — подобрен ОИСП 407 (крайни точки основани на ендокринни механизми) — изследвания на мъжки и женски в пубертет — изследване на невредими полово зрели мъжки 	<ul style="list-style-type: none"> — Изсл. гонадна хистопатология при риби — Изследване на метаморфоза при жаби
<p>Равнище 5 Изпитвания <i>in vivo</i> предоставящи данни за ефекти от ендокринни и други механизми</p>	<ul style="list-style-type: none"> — изследване на 1 поколение (TG415 подобр.)¹ — изследване на 2 поколения (TG416 подобр.)¹ — изп. скрининг на репродукция (TG421 подобр.)¹ — комбинирано скринингово изпитване 28 дни/репродукция (TG 422 подобр.)¹ <p>¹ Потенциални подобрения ще се разглежат от ГУВб</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Изследвания за частичен и пълен жизнен цикъл при риби, птици, земно-водни и безгръбначни (на развиващия се организъм и репродукция)

ГУВб: Група за управление на валидирането при изпитване и оценка на бозайници

▼ M5**БЕЛЕЖКИ КЪМ РАМКАТА**

- Бележка 1:* Въвеждане на всички равнища и напускане на всички равнища е възможно и зависи от естеството на съществуващите потребности от информация за целите на оценката на опасността и риска.
- Бележка 2:* На равнище 5 екотоксикологията следва да включва крайни точки, които дават показания за механизми за вредни ефекти, както и потенциални увреждания на равнище популация.
- Бележка 3:* Когато даден мултимодален модел покрива няколко от отделните изследвания на крайни точки, този модел следва да замени използването на тези изследвания на крайни точки
- Бележка 4:* Оценката на всеки химикал следва да се извършва въз основа на всеки отделен случай, като се взема предвид цялата достъпна информация и като се отчита функцията на равнищата на рамката.
- Бележка 5:* Към настоящия момент рамката не следва да се счита за всеобхватна. На равнища 3, 4 и 5 тя включва изследвания, които или са налични, или по отношение на тях е в ход валидиране. Що се отнася до последните, те са включени временно. След като бъдат разработени и валидирани, те ще бъдат официално добавени към рамката.
- Бележка 6:* Равнище 5 не следва да се разглежда като включващо само окончателни изпитвания. Счита се, че изпитванията, включени на това равнище, допринасят за общата оценка на опасността и риска.

▼ **M5****ЛИТЕРАТУРА**

- (1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment № 38. ENV/JM/MONO(2003)1.
- (3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445-520.
- (4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase I. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment № 65. ENV/JM/MONO(2006)33.
- (5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785-94.
- (6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment № 66. ENV/JM/MONO(2006)34.
- (7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. Environ. Health Persp.111:1530-1549
- (8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp.111:1550-1558.
- (9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.
- (10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [¹²⁵I]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582-587.
- (11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17 β -estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.
- (12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10-15.
- (13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650-651.
- (14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425-427.
- (15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec.106:369-373.

▼ M5

- (16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment № 67.
- (17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* 128:145-157.
- (18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. *Food Chem. Toxicol.* 41:1517-1525.
- (19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. *Arch. Toxicol.* 76:613-620.
- (20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. *Comp. Med.* 53:477-485.
- (21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20:343-347.
- (22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. *Cancer Detect. Prev.* 26:381-393.
- (23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. *Lab. Anim. Sci.* 37:596-601.
- (24) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals № 425.
- (25) OECD (2000). Ръководство относно признаването, оценяването и използването на клинични признаци като хуманен край за опитни животни, използвани за оценка на безопасността. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- (27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. *J. Physiol.* 85: 320 — 333.
- (28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. *Endocrinology* 19: 33 — 41.
- (29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.* 34: 288 — 305.
- (30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. *Fertil. Steril.* 24: 284 — 291.
- (31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- (32) Dorfman R.I. (1962). *Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization.* New York, Academic Press.
- (33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. *ILAR J* 45(4): 401-416.

▼ M5

- (34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. *Toxicol Ind Health*. 14 (1-2): 159-184.
- (35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. *Science* 131:1807-1808.
- (36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. *J. Agric Food Chem*. 52, 1410-1414.
- (37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. № 71.
- (38) 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).

▼ M5

Б.55. БИОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА HERSHBERGER ПРИ ПЛЪХОВЕ: КРАТКОСРОЧНО СКРИНИНГОВО ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА (АНТИ)АНДРОГЕННИ СВОЙСТВА

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 441 (2009). През 1998 г. ОИСП стартира с висок приоритет дейност по преразглеждане на съществуващите указания и по разработване на нови указания за скрининг и изпитвания за потенциални нарушители на функциите на ендокринната система (1). Един от елементите на дейността беше да се разработи указание за биологичното изследване на Hershberger при плъхове. След няколко десетилетия на употреба от фармацевтичната промишленост, това изследване е било първоначално стандартизирано от официален комитет от експерти през 1962 г. като скринингов метод за андрогенни химикали (2). През 2001—2007 г. биологичното изследване на Hershberger при плъхове е преминало обширна програма за валидиране, включваща изготвянето на контекстуален преглед (23), съставяне на подробен документ с методите (3), разработване на ръководство за дисекция (21) и провеждане на обширни вътрешно- и междулабораторни изследвания за показване на надеждността и възпроизводимостта на биологичното изследване. Тези изследвания за валидирането бяха проведени с мощен референтен андроген (тестостеронов пропионат (TP)), два мощни синтетични андрогена (треболонов ацетат и метилтестостерон), мощен андрогенен лекарствен продукт (флутамид), мощен инхибитор на синтеза (финастерид) на естествен андроген (дихидротестостерон, ДНТ), няколко слаби антиандрогенни пестициди (линурон, винклозолин, процимидон, *p,p'*-ДДЕ), мощен инхибитор на 5 α -редуктаза (финастерид) и два известни отрицателни химикала (динитрофенол и нонилфенол) (4)(5)(6)(7)(8). Настоящият метод за изпитване е резултат от дългия исторически опит с биологичното изследване и опита, натрупан по време на програмата за изпитване за валидиране, и постигнатите резултати по нея.
2. Биологичното изследване на Hershberger е краткосрочно скринингово изследване *in vivo*, с използване на спомагателни тъкани от мъжката полова система. Изследването е с произход от 1930-те и е било изменено през 1940-те години, за да се включат реагиращите на андрогени мускули от мъжката полова система (2) (9—15). През 1960-те години над 700 възможни андрогена са били подложени на оценка, с използване на стандартизирана версия на протокола (2)(14), и използването на изследването както за андрогени, така и за антиандрогени е било считано за стандартен метод през 1960-те години (2)(15). Настоящото биологично изследване се основава на промените в теглото на пет андрогенно зависими тъкани в кастрирани мъжки плъхове в перипубертетна възраст. С него се извършва оценка на способността на даден химикал да прояви биологична активност, съответстваща на андрогенни агонисти, антагонисти или инхибитори на 5 α -редуктаза. Петте прицелни андрогенно зависими тъкани, включени в този метод за изпитване, са вентрален дял на простатата (VP), семенно мехурче (SV) (плюс течности и коагулиращи жлези), анален повдигач и луковичнопещерист мускул (LABC), чифтни жлези на Каупър (COW) и главичка на penis (GP). При кастрираните мъжки плъхове в перипубертетна възраст всички тези пет тъкани реагират на андрогени с увеличение в абсолютно тегло. Когато същите тези тъкани са стимулирани да увеличат теглото си чрез прилагане на мощен референтен андроген, всичките тези пет тъкани реагират на антиандрогени с намаляване в абсолютно тегло. Изходен модел за биологичното изследване на Hershberger при плъхове е бил хирургически кастрираният мъжки плъх в перипубертетна възраст, който е бил валидиран при етапи 1, 2 и 3 от програмата за валидиране на изследването на Hershberger.
3. Биологичното изследване на Hershberger служи като механистично скринингово изследване *in vivo* за андрогенни агонисти, андрогенни антагонисти и инхибитори на 5 α -редуктаза и неговото прилагане следва да се разглежда в контекста на „Концептуалната рамка на ОИСП за изпитване и оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система“ (Допълнение 2). В тази концептуална рамка биологичното изследване на Hershberger се съдържа в равнище 3 като изследване *in vivo*, предоставящо данни относно отделен ендокринен механизъм, т.е. (анти)андрогенност. То е предназначено

▼ M5

да бъде включено в батерия от изпитвания *in vitro* и *in vivo* за установяване на химикали, които имат потенциала да взаимодействат с ендокринната система, които в крайна сметка водят до оценки на риска за човешкото здраве или околната среда.

4. Поради опасения, свързани с хуманното отношение към животните във връзка с процедурата по кастрация, с оглед избягване на етапа на кастрацията, като алтернативен модел за биологичното изследване на Hershberger са проучвани интактни (некастрирани) стимулирани отбити мъжки животни. Методът за изпитване със стимулирани отбити животни е валидиран (24); в изследванията за валидиране обаче вариантът с отбити животни на биологичното изследване на Hershberger не е успял, при изпитваните дози, последователно да открие предизвикани от слаби антиандрогени ефекти върху теглата на андрогенно зависими органи. Поради това той не е включен в настоящия метод за изпитване. Същевременно, като се признава, че неговото използване може да предостави не само ползи за хуманното отношение към животните, но може също да предостави информация и за други начини на действие, същият е на разположение в Ръководство № 115 на ОИСП (25).

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

5. Андрогенните агонисти и антагонисти действат като лиганди за андрогенния рецептор и могат да активират или съответно да потискат генната транскрипция, контролирана от рецептора. Освен това някои химикали инхибират превръщането на тестостерона в по-мощния естествен андроген дихидротестостерон в някои прицелни андрогенно зависими тъкани (инхибитори на 5 α -редуктаза). Подобни химикали имат потенциал да доведат до опасност за здравето, включително ефекти върху репродукцията и развиващия се организъм. Поради това съществува регулаторна необходимост от бързо извършване на оценка на даден химикал като възможен андрогенен агонист или антагонист, или инхибитор на 5 α -редуктаза. Макар и даващ информация, афинитетът на даден лиганд към даден андрогенен рецептор, измерен чрез свързване към рецептор или транскрипционно активиране на репортерни гени *in vitro* не е единственият определящ фактор за евентуален риск. Други фактори включват метаболитно активиране и деактивиране при въвеждане в тялото, разпределение на химикала в прицелните тъкани, и клирънс от тялото. Това води до необходимост от скрининг на възможната активност на химикал *in vivo* при относими условия и експозиция. Оценката *in vivo* е по-малко решаваща, ако са известни характеристиките на химикала по отношение на абсорбция — разпределение — метаболизъм — екскреция (APME). Андрогенно зависимите тъкани реагират с бърз и енергичен растеж на стимулиране от андрогени, особено при кастрирани мъжки плъхове в перипубертетна възраст. Различни видове гризачи, особено плъховете, се използват също така широко в изследванията за токсичност за характеризиране на риска. Поради това, версията на изследването, при която се използват кастрирани плъхове в перипубертетна възраст и пет прицелни тъкани, е подходяща за скрининг *in vivo* на андрогенни агонисти и антагонисти, и инхибитори на 5 α -редуктаза.
6. Настоящият метод за изпитване се основава на тези протоколи, използвани в изследването на ОИСП за валидиране, които са показали, че са надеждни и възпроизводими във вътрешно- и междулабораторни изследвания (4)(5)(6)(7)(8). В настоящия метод за изпитване са представени процедури както за андрогени, така и за антиандрогени.
7. Въпреки че е имало известно вариране в дозата на ТР за откриване на антиандрогени в програмата на ОИСП за валидиране на биологичното изследване на Hershberger при различните лаборатории (0,2 в сравнение с 0,4 mg/kg/ден, подкожно инжектиране), имало е малка разлика между тези два варианта на протоколи по отношение на способността за откриване на слаба или силна антиандрогенна активност. Ясно е обаче, че дозата на ТР не трябва да бъде толкова висока, че да блокира ефектите на антагонистите на рецепторите на слаби андрогени, нито толкова ниска, че андрогенните тъкани да реагират със слаб растеж дори без съвместно прилагане на антиандрогени.

▼ M5

8. Произходът на реакцията на растеж на отделните андрогенно зависими тъкани не е изцяло андрогенен, т.е. химикали, различни от андрогенни агонисти, могат да променят темпото на някои тъкани. Независимо от това, реакцията на растеж от страна на няколко тъкани едновременно доказва в по-голяма степен андрогенно-специфичен механизъм. Например високи дози от мощни естрогени могат да увеличат темпото на семенните мехурчета; другите андрогенно зависими тъкани от изследването обаче не реагират по подобен начин. Антиандрогенните химикали могат да действат като антагонисти на андрогения рецептор (AR) или като инхибитори на 5 α -редуктаза. Инхибиторите на 5 α -редуктаза са с променлив ефект, тъй като превръщането в по-мощния дихидротестостерон варира в отделните тъкани. Антиандрогени, които потискат 5 α -редуктаза, като например финастерид, имат по-силно изразени ефекти във вентралния дял на простатата, отколкото в други тъкани, в сравнение с мощен антагонист на AR, като например флутамид. Тази разлика в тъканния отговор може да се използва, за да се направи разграничение между начина на въздействие чрез AR и този чрез 5 α -редуктаза. Освен това AR е еволюционно свързан с този на други стероидни хормони, и някои други хормони, прилагани при високи, надфизиологични нива на доза, могат да се свържат и да антагонизират стимулиращите растежа ефекти на TR (13). Освен това, също така е реалистично засиленият стероиден метаболизъм и последващото намаляване на серумния тестостерон да намалят растежа на андрогенно зависими тъкани. Следователно, всякакви положителни резултати при биологичното изследване на Hershberger обикновено следва да бъдат оценявани с помощта на подход, основан на тежестта на доказателствата, включително изследвания *in vitro*, като изследванията за свързване към AR и естрогенни рецептори (ER), и съответстващите изследвания за транскрипционно активиране, или от други изследвания *in vivo*, които разглеждат сходни прицелни андрогенно зависими тъкани, като изследването на мъжки животни в пубертетна възраст, 15-дневното изследване на интактни полово зрели мъжки животни или 28-дневното или 90-дневното изследвания с повтарящи се дози.
9. Опитът сочи, че ксенобиотичните андрогени са по-редки от ксенобиотичните антиандрогени. Очакването следователно е, че биологичното изследване на Hershberger ще се използва най-често за скрининг на антиандрогени. Процедурата за изпитване за андрогени обаче може, независимо от това, да бъде препоръчана за стероидни или стероидо-подобни химикали, или за химикали, за които показание за възможни андрогенни ефекти е било получено чрез методите, съдържащи се в равнище 1 или 2 от концептуалната рамка (допълнение 2). По подобен начин, неблагоприятни ефекти, свързани с (анти)андрогенни профили, могат да се наблюдават при изследвания на равнище 5 и да водят до необходимост от оценка на това дали даден химикал въздейства по ендокринен път.
10. Възприето е, че всички процедури, свързани с животни, следва 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 местни разпоредби, като например Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 г. относно защитата на животните, използвани за научни цели (26). По-нататъшни указания за хуманното отношение към животните се дават от ОИСР (17).
11. Както при всяко биологично изследване с използване на опитни животни, необходимостта от извършване на това изследване трябва да бъде внимателно преценена. По същество може да има две причини за такова решение:
- висок потенциал за експозиция (равнище 1 от Концептуалната рамка) или признаци за (анти)андрогенност в изследвания *in vitro* (равнище 2), подкрепящи проучване дали такива ефекти могат да настъпят *in vivo*;
 - ефекти, съответстващи на (анти)андрогенност в изпитвания *in vivo* от равнище 4 или 5, подкрепящи проучване на конкретния начин на действие, например за да се определи дали ефектите се дължат на (анти)андрогенен механизъм.

▼ M5

12. Определенията, използвани за този метод за изпитване, са дадени в допълнение 1.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

13. Чувствителността при биологичното изследване на Hershberger се постига чрез използване на мъжки животни с минимално ендогенно производство на андрогени. Това се постига чрез използването на кастрирани мъжки животни, при условие че е осигурено достатъчно време след кастрацията, за да може основното тегло на прицелните тъкани да достигне минимална еднаква стойност. По този начин, при скрининг за потенциална андрогенна активност са налице ниски ендогенни нива на циркулиращи андрогени, хипоталамус-хипофиза-гонадната ос не е в състояние да компенсира чрез механизми за обратна връзка, способността на тъканите за даване на отговор е максимална, а варирането в началното тъканно тегло е сведено до минимум. При скрининг за потенциална антиандрогенна активност, по-последователно наддаване на тъканно тегло може да се постигне, когато тъканите се стимулират чрез референтен андроген. В резултат на това при биологичното изследване на Hershberger се изискват само 6 животни за група на определена доза, докато при други изпитвания с интактни мъжки животни, в пубертетна възраст или полово зрели, се предлага използване на 15 мъжки животни за група на определена доза.
14. Кастрирането на мъжките плъхове в перипубертетна възраст следва да се извърши по подходящ начин с използване на одобрени анестетици и асептична техника. През първите няколко дни след хирургичната интервенция следва да се прилагат обезболяващи средства, за да се елиминира постхирургичният дискомфорт. Кастрирането подобрява точността на изследването при откриване на слаби андрогени и антиандрогени чрез премахване на компенсаторните ответни ендокринни механизми, съществуващи в интактното животно, които могат да смекчат последиците от прилаганите андрогени и антиандрогени, и чрез премахване на голямото вариране на равнищата на серумен тестостерон между отделните индивиди. Следователно, кастрацията намалява броя на животните, изисквани с цел скрининг на тази ендокринна активност.
15. При скрининг за потенциална андрогенна дейност, изпитваният химикал се приема всекидневно по орален път през сонда или чрез подкожно инжектиране за период от десет последователни дни. Изпитваните химикали се прилагат най-малко на две третирани групи от опитни животни, като за всяка група се използва по едно ниво на доза. Животните се подлагат на аутопсия приблизително 24 часа след последната доза. Статистически значимо увеличение на теглото на два или повече прицелни органа в третираните с изпитвания химикал групи спрямо контролната група на носител показва, че изпитваният химикал е положителен по отношение на потенциална андрогенна активност (вж. параграф 60). Андрогени, като например тренболон, които не могат да бъдат 5 α -редуцирани, имат по-силно изразени ефекти върху LABC и GP спрямо TP, но всички тъкани следва да показват увеличен растеж.
16. При скрининг за потенциална андрогенна дейност, изпитваният химикал се приема всекидневно по орален път през сонда или чрез подкожно инжектиране за период от десет последователни дни, съгласувано с ежедневни дози TP (0,2 или 0,4 mg/kg/ден) чрез подкожно инжектиране. В програмата за валидиране е установено, че могат да се използват или 0,2 или 0,4 mg/kg/ден TP, тъй като и двете са ефективни в откриването на антиандрогени, и следователно само една доза следва да бъде избрана за използване при изследването. Постепенни дози от изпитвания химикал се прилагат в най-малко три третирани групи от опитни животни, като се използва по една доза за група. Животните се подлагат на аутопсия приблизително 24 часа след последната доза. Статистически значимо намаление на теглото на два или повече прицелни органа в третираните с изпитвания химикал плюс TP групи спрямо контролната група само на TP показва, че изпитваният химикал е положителен по отношение на потенциална антиандрогенна активност (вж. параграф 61.).

▼ M5

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Избор на вида и породата

17. Плъховете и мишки се използват редовно за биологичното изследване на Hershberger от 1930-те години насам. Въпреки че от биологична гледна точка е реалистично и плъховете, и мишките да покажат сходен отговор, въз основа на 70-годишния опит с модела с плъхове, плъхът е избраният вид за биологичното изследване на Hershberger. В допълнение, когато данните от дадено биологичното изследване на Hershberger могат да бъдат предварителни по отношение на дългосрочно изследване върху няколко поколения, това позволява в двете изследвания да се използват животни от същите вид, порода и източник.
18. Този протокол позволява на лабораториите да избират породата на плъховете, която да използват при изследването, и която по принцип би следвало да бъде традиционно използваната от участващата лаборатория. Могат да се използват обичайно използваните лабораторни породи плъхове; породи, при които зрялата възраст настъпва значително по-късно от 42 дни обаче не бива да се използват, тъй като кастриране на мъжки животни на възраст 42 дни би могло да изключи измерване на теглото на главичката на пениса, което може да бъде направено единствено след отделянето на препуциума от тялото на пениса. По този начин породите, получени от плъха Fisher 344, не трябва да се използват, с изключение на някои редки случаи. Плъхът Fisher 344 има различен времеви график по отношение на сексуалното развитие в сравнение с други по-често използвани породи като Sprague Dawley или Wistar (16). Ако трябва да бъде използвана тази порода, лабораторията би следвало да кастрира плъховете от нея на малко по-късна възраст и да е в състояние да демонстрира чувствителността на използваната порода. Обосновката за избора на породата плъхове следва да бъде ясно посочена от лабораторията. Когато скрининговото изследване може да служи като предварително за изследване на оралната токсичност с повтаряща се доза, за изследване на токсичността за репродукцията и за развиващия се организъм, или за дългосрочно изследване, за предпочитане е при всички изследвания да бъдат използвани животни от една и съща порода и източник.

Условия на отглеждане и хранене

19. Всички процедури трябва да са в съответствие с всички местни стандарти за полагане на грижи за лабораторни животни. Тези описания на грижите и третирането представляват минимални стандарти и се заменят от по-строги местни разпоредби, като например Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 г. относно защитата на животните, използвани за научни цели (26). Температурата в стаята на опитните животни трябва да бъде 22 °C (с приблизително отклонение ± 3 °C). Относителната влажност следва да бъде най-малко 30 % и е препоръчително тя да не надвишава 70 % освен по време на почистване на помещението. Целта следва да бъде относителна влажност 50—60 %. Осветлението трябва да бъде изкуствено. Ежедневната последователност при осветлението трябва да е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина.
20. Отглеждането в група е за предпочитане пред изолацията, поради младата възраст на животните и поради факта, че плъховете са социални животни. Чрез отглеждането на две или три животни в клетка се избягва струпване и свързания с него стрес, които могат да попречат на хормоналния контрол на развитието на спомагателни тъкани от половата система. Клетките трябва да бъдат щателно почиствани за отстраняване на възможни замърсители и подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. С клетки с подходящ размер (~2000 кв. см) струпването се предотвратява.
21. Всяко животно трябва да бъде отделно идентифицирано (например с ушна марка или етикет) с използване на хуманен метод. Методът на идентифициране трябва да бъде записан.

▼ M5

22. Лабораторна храна и питейна вода трябва да се предоставят *ad libitum*. Лабораторията, извършваща биологичното изследване на Hershberger, следва да използва лабораторния хранителен режим, който тя обикновено използва в работата си по изпитване на химикали. При проучванията за валидиране на биологичното изследване не са наблюдавани ефекти или вариране, които да могат да бъдат приписани на хранителния режим. Използваният хранителен режим трябва да бъде записван и следва да бъде запазена проба от лабораторния хранителен режим за евентуален бъдещ анализ.

Критерии за параметрите на теглото на андрогенно зависимите органи

23. По време на изследването за валидиране не са открити доказателства за това, че намаляването на телесното тегло е засегнало увеличаването или намаляването на теглото на прицелните тъкани (т.е., онези, които трябва да бъдат претеглени в посоченото изследване).
24. Сред различните породи плъхове, използвани успешно в програмата за валидиране, теглото на андрогенно зависимите органи при породите с по-голямо тегло е по-голямо, отколкото при породите с по-малко тегло. Поради това критериите за параметрите на теглото при биологичното изследване на Hershberger не включват очаквани абсолютни стойности на теглото на органите за положителните и отрицателните контроли.
25. Тъй като коефициентът на вариация (CV) за дадена тъкан е обратно-пропорционален на статистическата мощност, критериите за параметрите при биологичното изследване на Hershberger са основани върху максималните стойности на CV за всяка тъкан (Таблица 1). Коефициентите на вариация са получени от изследванията на ОИСП за валидиране. В случай на отрицателни резултати, лабораториите следва да проучат коефициентите на вариация от контролната група и третираната с висока доза група, за да определят дали свързаните с максималните стойности на CV критерии за параметрите са били превишени.
26. Изследването трябва да се повтори, когато: 1) три или повече от десетте възможни отделни коефициенти на вариация от контролната група и третираната с висока доза група надвишават максимумите, определени за изследвания на агонисти и антагонисти в таблица 1, и 2) поне две прицелни тъкани са били засегнати незначително, т.е. стойностите на ρ за тях са между 0,05 и 0,10.

Таблица 1

Максимално допустими коефициенти на вариация, определени за прицелните спомагателни тъкани от половата система за модела с кастрирани животни в изследванията на ОИСП за валидиране ⁽¹⁾

Тъкан	Антиандрогенни ефекти	Андрогенни ефекти
Семенни мехурчета	40 %	40 %
Вентрален дял на простатата	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Жлези на Каупър	35 %	55 %
Главичка на пениса	17 %	22 %

⁽¹⁾ Праговият CV за дадена тъкан е бил идентифициран от графика на подредени от най-малката последователно до най-голямата стойности на CV за всички средни стойности от всички опити, свързани с валидирането, използващи конкретен модел (агонист или антагонист). Праговият CV е отчетен от „точката на прекъсване“ — точката, от която увеличенията между следващите CV с най-високи стойности от последователността са значително по-големи от увеличенията, които разделят няколкото предходни CV. Следва да се отбележи, че въпреки че в резултат на този анализ са определени относително надеждни „точки на прекъсване“ за модела на изследване с антагонист, кривите на CV за изследването с агонист са показали по-еднообразно увеличение, поради което идентификацията на прагов CV по този метод е била в известна степен произволна.

▼ **M5****ПРОЦЕДУРА****Спазване на регулаторните изисквания и проверка на лабораторията**

27. За разлика от утеротрофичното биологично изследване (глава Б.54 от настоящото приложение), демонстрация на пригодността на лабораторията преди началото на изследването не е необходима за биологичното изследване на Hershberger, тъй като изпитването на паралелните положителни (тестостеронов пропионат и флутамид) и отрицателни контроли се провежда независимо като неразделна част от изследването.

Брой и състояние на животните

28. Всяка третирана и контролна група трябва да включва минимум 6 животни. Това се отнася както за андрогенните, така и за антиандрогенните протоколи.

Кастриране

29. Трябва да има първоначален период за аклиматизация от няколко дни след получаване на животните, за да се гарантира, че животните са в добро здраве и се развиват добре. Тъй като при животните, кастрирани на възраст по-малка от 42 дни, или преди постнатален ден (ПНД) 42, може да не е настъпило отделяне на препуциума, животните следва да бъдат кастрирани на ПНД 42 или след това, но не и преди това. Животните се кастрират под анестезия чрез инцизия в скротума и отстраняване както на тестисите, така и на епидидимите, и с лигиране на кръвоносните съдове и отводните канали на семенните мехурчета. След потвърждаване, че не се наблюдава кръвотечение, скротумът трябва да бъде затворен с хирургичен шев или с автоматични скоби (autoclips). Животните следва да бъдат третирани с обезболяващи средства през първите няколко дни след хирургичната интервенция за смекчаване на всякакъв постхирургичен дискомфорт. Ако кастрираните животни са закупени от доставчик на животни, възрастта на животните и степента на полова зрялост следва да бъдат гарантирани от доставчика.

Аклиматизация след кастрирането

30. Аклиматизацията на животните към лабораторните условия следва да продължи, за да се даде възможност за намаляването на теллото на прицелната тъкан за период най-малко от 7 дни след кастрирането. Животните трябва да бъдат наблюдавани ежедневно и всички животни с признаци на заболяване или физически аномалии следва да бъдат отстранени. По този начин, началото на третирането чрез започване на дозирането (по време на изследването) може да започне на възраст от ПНД 49, но не по-късно от ПНД 60. Възрастта при аутопсията не трябва да надвишава ПНД 70. Тази гъвкавост позволява на лабораториите да изготвят ефикасен график на експерименталните дейности.

Телесно тегло и разпределение по групи на случаен принцип

31. Различията в индивидуалните телесни тегла са източник на вариране в теллото на тъканите както в рамките на дадена група животни, така и между групите от животни. Увеличеното вариране в теллото на тъканите води до увеличен коефициент на вариация (CV) и намалява статистическата мощност на изследването (наричана понякога чувствителност на изследването). Поради това колебанията в телесното тегло следва да бъдат контролирани както експериментално, така и статистически.
32. Експерименталният контрол включва предизвикване на малки колебания в телесното тегло в рамките на отделните изследвани групи и между тях. Първо, необичайно малки или големи животни трябва да се избягват и да не се поставят в изследваната кохорта. При започване на изследването колебанията в теллото на използваните животни не трябва да превишават $\pm 20\%$ от средното тегло (например $175\text{ g} \pm 35\text{ g}$ за кастрирани плъхове в перипубертетна възраст). Второ, животните трябва да бъдат разпределени към групи (както контролни, така и третирани) чрез случайно разпределение по тегло, така че средното телесно тегло във всяка група да не е статистически различно от това в която и да е друга група. Процедурата за случаен подбор по блокове, която се използва, трябва да бъде записана.

▼ M5

33. Тъй като токсичността може да доведе до намаляване на телесното тегло на третираните групи по отношение на контролната група, като статистически ковариант може да се използва телесното тегло през първия ден от прилагането на изпитвания химикал, а не телесно тегло към момента на аутопсията.

Дозирание

34. С цел да се установи дали даден изпитван химикал може да има андрогенно действие *in vivo*, две групи с определена доза от изпитвания химикал плюс положителна контрола и контрола на носител (отрицателна) (вж. параграф 43) обичайно са достатъчни и затова тази постановка е предпочитана от съображения за хуманно отношение към животните. Ако целта е да се получи крива доза-отговор или да се екстраполира към по-ниски дози, необходими са най-малко 3 групи с определена доза. Ако се изисква информация извън тази за андрогенната активност (като например оценка на ефикасността), трябва да бъде взета под внимание отделна схема на дозирание. За изпитване за антиандрогени, изпитваният химикал се прилага заедно с референтен андрогенен агонист. Следва да се използват най-малко 3 изпитвани групи с различни дози на изпитвания химикал и положителна и отрицателна контрола (вж. параграф 44). С изключение на третиране с изпитвания химикал, животните в контролната група трябва да бъдат отглеждани по идентичен начин на този при животните от изпитваната група. Ако за прилагане на изпитвания химикал се използва носител, контролната група трябва да получава най-голямото използвано при изпитваните групи количество носител.

35. Всички нива на доза следва да се предлагат и подбират, като се имат предвид всички достъпни токсикологични и токсикокинетични данни за изпитвания химикал или за свързани с него материали. Най-високото ниво на доза следва, първо, да вземе под внимание стойността на LD₅₀ и/или информация за остра токсичност с цел да се избегне смърт, силно страдание или дистрес при животните (17)(18)(19)(20) и, второ, да вземе предвид наличната информация за използваните дози в субхронични и хронични проучвания. Като цяло, най-високата доза следва да не предизвиква намаляване в крайното телесно тегло на животните, по-голямо от 10 % от контролното тегло. Най-високата доза следва да бъде по-ниската от следните: 1) най-високата доза, която гарантира оцеляването на животното и която е без значителна токсичност или дистрес на животните след 10 последователни дни на прилагане до максимална доза от 1 000 mg/kg/ден (вж. параграф 36), или 2) доза, предизвикваща (анти)андрогенни ефекти. Като скрининг, големи интервали, напр. половин логаритмична единица, отговаряща на кратност на дозата, равна на 3,2, или дори една логаритмична единица между дозиранията са общо-приемливи. Ако няма достъпни подходящи данни, може да се проведе изследване за определяне на обхвата (вж. параграф 37), което да подпомогне определянето на използваните дози.

Равнище на пределна доза

36. Ако изпитване при гранична доза от 1 000 mg/kg телесно тегло на ден и по-ниска доза, с използване на процедурите, описани в това изследване, не успее да предизвика статистически значима промяна в теглото на репродуктивните органи, допълнителни нива на доза могат да бъдат счестени за ненужни. Пределната доза се прилага, освен когато данните за експозиция на хора подсказват нуждата от използване на по-високо ниво на доза.

Съображения при определянето на обхвата

37. Ако е необходимо, може да се извърши предварително изследване за определяне на обхвата, с малко на брой животни, за да се изберат подходящи групи с определена доза [с използване на методи за изпитване за остра токсичност (глави Б.1А, Б.1Б от настоящото приложение (27), ОИСП TG 425 (19)]. Целта в случая на биологичното изследване на Hershberger е да се изберат дози, които гарантират оцеляването на животните, и които са без значителна токсичност или

▼ **M5**

дистрес за животните след десет последователни дни на прилагане на химикала до пределна доза от 1 000 mg/kg/ден, както е посочено в параграфи 35 и 36. В това отношение може да се използва ръководство на ОИСП (17) за определяне на клиничните признаци, които показват токсичност или дистрес за животните. Ако е осъществимо в рамките на това изследване за определяне на обхвата след десет дни от прилагането, прицелните тъкани могат да бъдат изрязани и претеглени приблизително 24 часа след прилагане на последната доза. След това тези данни биха могли да се използват за подпомагане на избора на дозите в основното изследване.

Референтни химикали и носител

38. Референтният андрогенен агонист следва да бъде тестостеронов пропионат (TP), CAS № 57-82-5. Референтната доза TP може да бъде или 0,2 mg/kg телесно тегло на ден или 0,4 mg/kg телесно тегло на ден. Референтният андрогенен антагонист следва да бъде флутамид (FT), CAS № 1311-84-7. Референтната доза FT следва да бъде 3 mg/kg телесно тегло на ден, и FT следва да се прилага съвместно с референтната доза TP.
39. Препоръчва се, винаги когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на воден разтвор/суспензия. Но тъй като много андрогенни лиганди или техните метаболитни прекурсори са хидрофобни, най-често използваният подход е използване на разтвор/суспензия в масло (напр. царевично, фъстъчено, сусамово или маслиново масло). Изпитваните химикали могат да бъдат разтворени в минимално количество 95 % етанол или други подходящи разтворители, и разредени до окончателните работни концентрации в изпитвания носител. Токсичните характеристики на разтворителя трябва да бъдат известни и следва да се изпитат в отделна контролна група само на разтворител. Ако изпитваният химикал се счита за стабилен, може да се използва слабо нагриване и енергично механично действие за подпомагане на разтварянето на изпитвания химикал. Трябва да бъде определена стабилността на изпитвания химикал в носителя. Ако изпитваният химикал е стабилен за периода на изследването, тогава може да бъде приготвена една начална аликвотна част от изпитвания химикал, и определените разреждания на дозата да се приготвят всеки ден, като се внимава да се избегне замърсяване или разваляне на пробите.

Прилагане на дозите

40. TP следва да бъде прилаган чрез подкожна инжекция, а FT — по орален път през сонда.
41. Изпитваният химикал се прилага по орален път през сонда или чрез подкожно инжектиране. Съображенията за хуманно отношение към животните и физичните/химичните свойства на изпитвания химикал трябва да се вземат под внимание при избора на пътя на прилагане. В допълнение, токсикологичните аспекти, като например относимост към пътя на експозиция на химикала при хора (напр. относимост на орален път през сонда към експозиция чрез поглъщане, или на подкожно инжектиране към вдишване или към дермална адсорбция) и съществуващата токсикологична информация и данни за метаболизма и кинетиката (напр. необходимост да се избегне ефектът на първото преминаване, по-добра ефикасност чрез конкретен път) следва да бъдат взети предвид, преди да се започне изчерпателно дългосрочно изпитване, ако се получат положителни резултати чрез инжектиране.
42. Животните трябва да бъдат дозирани по същия начин и в същата времева последователност за срок от десет последователни дни на приблизително 24-часови интервали. Нивото на дневната доза трябва да се коригира ежедневно въз основа на паралелните дневни измервания на телесното тегло. Обемът на дозата и часът на нейното прилагане трябва да се отчитат за всеки ден на експозиция. Трябва да се вземат мерки, за да не се превишава максималната доза, описана в

▼ M5

параграф 35, за да се даде възможност за съдържателно тълкуване на данните. Намаляването на телесното тегло, клиничните признаци и други находки следва да бъдат подробно оценени в това отношение. За орален път през сонда трябва да се използва стомашна тръба или подходяща интубационна канюла. Максималният обем течност, който може да бъде въведен еднократно, зависи от телесното тегло на изпитваното животно. Следва да се спазват местните насоки за грижи за животните, но обемът не следва да превишава 5 ml/kg телесно тегло, освен в случай на водни разтвори, където могат да бъдат използвани 10 ml/kg телесно тегло. За подкожни инжекции в дорзално-скапуларната и поясната област дозите трябва да се прилагат посредством стерилна игла (напр. 23G или 25G) и туберкулинова спринцовка. Бръсненето на мястото на инжектиране е по избор. Всякакви загуби, изтичане на мястото на инжектиране или непълно дозиране трябва да бъдат записвани. Общият инжектиран обем на плъх на ден не трябва да надхвърля 0,5 ml/kg телесно тегло.

Специфични процедури за андрогенни агонисти

43. За изпитването на андрогенни агонисти носителят е отрицателната контрола, а третираната с TP група е положителната контрола. Биологичната активност, съответстваща на андрогенните агонисти, се изпитва с прилагане на изпитван химикал на третирани групи в избраните дози за 10 последователни дни. Теглата на петте спомагателни тъкани от половата система в групите на изпитван химикал се сравняват с тези в групите на носител за откриване на статистически значими увеличения на теглото.

Специфични процедури за андрогенни антагонисти и инхибитори на 5 α -редуктаза

44. За изпитването на андрогенни антагонисти и инхибитори на 5 α -редуктаза, третираната с TP група е отрицателната контрола, а групата, на която се прилагат съвместно референтни дози TP и FT е положителната контрола. Биологичната активност, съответстваща на андрогенни антагонисти и инхибитори на 5 α -редуктаза, се изпитва с прилагане на референтна доза TP и прилагане на изпитвания химикал в продължение на 10 последователни дни. Теглата на петте спомагателни тъкани от половата система в групите на TP плюс групите на изпитван химикал се сравняват с тези в групата само на референтен TP за откриване на статистически значими намаления на теглото.

НАБЛЮДЕНИЯ**Клинични наблюдения**

45. Общи клинични наблюдения следва да бъдат извършвани поне един път дневно и по-често, когато се наблюдават признаци на токсичност. Наблюденията следва да се извършват за предпочитане по едно и също време всеки ден и като се има предвид върховият период на предвидените ефекти след получаване на дозата. Всички животни следва да бъдат наблюдавани за смъртност, заболяемост и общи клинични признаци като промяна в поведението, кожата, козината, очите, мукозните мембрани, поява на секреция и екскреция, както и автономна активност (напр. сълзене, пилоерекция, промяна в големината на зениците, необичаен начин на дишане).
46. Всяко животно, намерено мъртво, следва да се отстрани и унищожи без допълнителен анализ на данни. Всякаква смъртност на животни преди аутопсия, следва да бъде записана в изследването, заедно с всички видими причини за смъртността. Всяко животно в терминално състояние трябва да бъде умъртвено по хуманен начин. Всяко животно, което е в терминално състояние и впоследствие е подложено на евтаназия, следва да бъде записано в изследването, заедно с видими причини за терминалното състояние.

▼ M5

Телесно тегло и консумация на храна

47. Всички животни трябва да бъдат претегляни дневно с точност до 0,1 g, като се започне точно преди започване на третирането, т.е., когато животните се разпределят на групи. Като незадължително измерване, количеството на консумираната храна през периода на третиране може да бъде измерено за отделната клетка чрез претегляне на хранилката. Резултатите за консумацията на храна следва да бъдат изразени в грамове на плъх дневно.

Дисекция и измерване на теглото на тъкани и органи

48. Приблизително 24 часа след последното прилагане на изпитвания химикал, плъховете следва да бъдат подложени на евтаназия и обезкръвени съгласно обичайните процедури на извършващата лаборатория, и да им бъде извършена аутопсия. Методът на умъртвяване по хуманен начин следва бъде записан в доклада на лабораторията.
49. В идеалния случай аутопсията следва да се извърши на случаен принцип между различните групи, за да се избегне поставянето на дадена група на първо или последно място, което може да повлияе на данните. Всяка констатация по време на аутопсията, т.е., патологични изменения/видими увреждания, следва да се отбележи и докладва.
50. Петте андрогенно зависими тъкани (VP, SV, LABC, COW, GP) следва да бъдат претеглени. Тези тъкани трябва да бъдат изрязани, внимателно почистени от излишна прилепнала тъкан и мазнина, и трябва да бъде определено теглото им в прясно състояние (нефиксирано). С всяка тъкан следва да се борави с особено внимание, за да се избегнат загубата на течности и изсушаването, които могат да доведат до значителни грешки и вариране чрез намаляването на записаните тегла. Няколко от тъканите могат да бъдат много малки или трудни за дисекция, и това води до вариране. Следователно е важно лицата, извършващи дисекцията на спомагателни тъкани от половата система, да са запознати със стандартните процедури за дисекция за тези тъкани. Наръчник за стандартна работна процедура (СРП) за дисекция е на разположение от ОИСП (21). Внимателното обучение в съответствие с ръководството за СОП ще сведе до минимум даден потенциален източник на колебания в изследването. В идеалния случай същият просектор следва да носи отговорност за дисекцията на дадена тъкан, за да се елиминират разликите между различните просектори при обработката на тъканта. Ако това не е възможно, аутопсията трябва да се планира така, че всеки просектор да извършва дисекция на дадена тъкан от всички третирани групи, вместо това един просектор да извършва дисекция на всички тъкани от дадена контролна група, докато друг отговаря за третирани групи. Всяка спомагателна тъкан от половата система трябва да бъде претеглена без изсушаване с точност до 0,1 mg, като теглото се записва за всяко животно.
51. Няколко от тъканите могат да бъдат много малки или трудни за дисекция, и това води до вариране. Предходният опит показва обхват на коефициента на вариация, който изглежда се различава на основата на различната пригодност на лабораторията. В няколко случая в рамките на конкретна лаборатория са наблюдавани големи разлики в абсолютните тегла на тъкани като VP и COW.
52. Измерванията на черен дроб и чифтни органи като бъбрек и надбъбречна жлеза са по избор. Отново, тъканите трябва да бъдат почистени от прилепнала фасция и мазнини. Черният дроб трябва бъде претеглен и записан с точност до 0,1 g, а чифтни органи като бъбрек и надбъбречна жлеза — с точност до 0,1 mg. Черният дроб, бъбреците и надбъбречните жлези не само се влияят от андрогени; те също така дават полезни показания за системна токсичност.

▼ M5

53. Измерването на серумен лутеинизиращ хормон (LH), фоликулостимулиращ хормон (FSH) и тестостерон (Т) е по избор. Серумните равнища на Т са полезни за определяне дали изпитваният химикал предизвиква понижаващ серумните равнища метаболизъм на тестостерона в черния дроб. Без данни за Т подобен ефект може да изглежда като предизвикан по андрогенен механизъм. Равнището на LH предоставя информация за способността на даден антиандроген не само да намали теллото на органите, но и да засегне хипоталамус-хипофизната функция, което при продължителни изследвания може да предизвика тумори на тестисите. FSH е важен хормон за сперматогенезата. Измерванията на серумните Т4 и Т3 също са по избор и могат да предоставят полезна допълнителна информация относно способността за нарушаване на хомеостазата на тиреоидните хормони. Ако следва да се извършват измервания на хормон, плъховете трябва да бъдат анестезирани преди аутопсията и кръвта да се вземе чрез сърдечна пункция, като методът за анестезия трябва да бъде избран внимателно с оглед да не се отрази на измерването на хормона. Методът на изготвяне на серума, източникът на комплекти за измерване за радиоимунното изследване или на други комплекти за измерване, процедурите за анализ, както и резултатите следва да бъдат записани. Равнищата на LH следва да бъдат отчитани в ng/ml серум, и Т трябва също така да бъде отчитан в ng/ml серум.
54. Дисекцията на тъканите се описва като следва с подробен наръчник за дисекция със снимки, публикуван като спомагателен материал като част от програмата за валидиране (21). На разположение е също така и видеоизображение на дисекцията на интернет страницата на Корейската администрация по храните и лекарствата (22).
- С обърната нагоре вентрална повърхност на животното се определя дали препуциумът на пениса е отделен от главичката на пениса. Ако е така, тогава препуциумът се отдръпва и главичката на пениса се отстранява и претегля (с точност до 0,1 mg), и теллото се записва;
 - Кожата на корема и коремната стена се отварят, при което се разкриват вътрешностите. Ако се претеглят органите по избор, отстранява се и се претегля черният дроб с точност до 0,1 g, отстраняват се стомахът и червата, отстраняват се и се претеглят чифтовете бърбери и надбъбречни жлези с точност до 0,1 mg. Тази дисекция разкрива пикочния мехур и започва дисекцията на прицелните спомагателни тъкани от мъжкото животно.
 - За дисекция на VP пикочният мехур се отделя от слоя на коремния мускул чрез разрез на съединителната тъкан по средната линия. Пикочният мехур се отмества в предна позиция към семенните мехурчета (SV), при което се разкриват левият и десният дял от вентралния дял на простатата (обхванати от слой от мазнини). Внимателно се раздалечава мазнината от левия и десния дял на VP. Леко се отмества десният дял на VP от уретрата и се дисектира дялът от уретрата. Докато все още се придържа десният дял на VP, леко се отмества левият дял на VP от уретрата и след това се дисектира; претегля се с точност до 0,1 mg и се записва теллото.
 - За дисекция на семенните мехурчета с коагулиращите жлези (SVCG) пикочният мехур се отмества каудално, при което се разкриват семепроводът и десният и левият дял на SVCG. Предотвратява се изтичането на течност чрез прикрепване на хемостат в основата на SVCG, където семепроводът се свързва с уретрата. Внимателно се извършва дисекция на SVCG, с прикрепен хемостат се почистват мазнините и придатъците, поставя се в тарирано тегловно блюдо, отстранява се хемостатът, претегля се с точност до 0,1 mg и се записва теллото.

▼ M5

- За дисекция на LABC се разкриват мускулите и основата на пениса. Мускулите на аналния повдигач (LA) са увити около колона, докато предните LA и луковичнопещерист мускул (BC) са прикрепени към луковиците на пениса. Кожата и придатъците от перианалната област, простираща се от основата на пениса до предния край на ануса, се отстраняват. На мускулите на BC постепенно се извършва дисекция от луковицата и тъканите на пениса. Колонът се срязва на две и може да бъде извършена дисекция на LABC и те да бъдат напълно отстранени. LABC се почистват от мазнини и придатъци, претеглят се с точност до 0,1 mg и теглото се записва.
 - След отстраняване на аналния повдигач и луковичнопещеристия мускул в основата на луковиците на пениса и леко дорзално от тях се виждат жлезата на Каупър или булбоуретралната жлеза. Изисква се внимателна дисекция, за да се избегне връзване в тънката капсула с оглед предотвратяване на изтичането на течност. Чифтните COW се претеглят с точност до 0,1 mg и теглото се записва.
 - В допълнение, ако по време на аутопсия или дисекция е изгубена течност от някоя жлеза, това трябва да бъде записано.
55. Ако оценката на всеки химикал изисква аутопсия на повече от разумното животно за един ден, началото на изследването може да се разпредели върху два последователни дни, в резултат на което аутопсията и свързаната с нея работа също се разпределя върху два дни. Ако е извършено такова разпределение, дневно следва да бъдат използвани половината от животните от третирана група.
56. Трупове следва да бъдат унищожавани по подходящ начин след аутопсията.

ДОКЛАДВАНЕ

Данни

57. Данните следва да се отчитат индивидуално (т.е. телесно тегло, тегла на спомагателни тъкани от половата система, измервания по избор и други отговори и наблюдения) и за всяка група от животни (средни стойности и стандартни отклонения за всички извършени измервания). Данните следва да бъдат обобщени в табличен вид. Данните трябва да показват броя на животните в началото на изпитването, броя на животните, намерени мъртви по време на изпитването или показващи признаци на токсичност, описание на наблюдаваните признаци на токсичност, включително време на настъпването им, продължителност и сила.
58. Заключителният доклад следва да включва:

Извършваща изпитвания лаборатория

- Наименование на лабораторията, местоположение на лабораторията
- Ръководител на изследването и друг персонал и отговорностите им във връзка с изследването
- Дати, на които е започнало и приключило изследването, т.е. първи ден от прилагането на изпитвания химикал и съответно последен ден на аутопсията.

Изпитван химикал

- Източник, партида/номер на партидата, идентичност, чистота, пълен адрес на доставчика и характеризирание на изпитвания(те) химикал(и)
- Физична природа и, където е относимо, физични и химични свойства;
- Условия на съхранение и метод и честота на изготвяне на разредени разтвори
- Всички събрани данни за стабилност
- Всички анализи на разтворите/суспензиите за дозиране

▼ M5*Носител*

- Характеризиране на носителя (идентичност, доставчик и номер на партида)
- Обосновка за избора на носител (когато носителят е различен от вода)

Изпитвани животни и процедури за отглеждане на животните

- Използван вид/порода и обосновка за избора
- Източник или доставчик на животни, включително пълен адрес
- Брой и възраст на доставените животни
- Условия на отглеждане (температура, осветление и др.)
- Хранителен режим (наименование, вид, доставчик, номер на партида, съдържание и, ако са известни, нива на фитоестрогени)
- Материал за постилане (наименование, вид, доставчик, съдържание)
- Условия на поставяне в клетки и брой на животните в клетка;

Условия на изследването

- Възраст при кастрирането и продължителност на аклиматизацията след кастрирането;
- Индивидуални тегла на животните в началото на изследването (с точност до 0,1 g);
- Процедура за разпределяне на случаен принцип и запис за разпределяне по групи на носител, референтен химикал, изпитван химикал и по клетки.
- Средна стойност и стандартно отклонение на телесните тегла за всяка група за всеки ден, в който се извършва претегляне по време на цялото изследване;
- Обосновка на избора на доза;
- Път за прилагането на изпитвания химикал и обосновка за избора на път на експозиция
- При изследване за антиандрогенност, третиране с ТР (доза и обем),
- Третиране с изпитван химикал (доза и обем),
- Час на дозиране
- Процедури по аутопсията, включително начини за обезкръвяване и всякаква анестезия
- Ако се извършват анализи на серум, следва да бъдат дадени подробности за метода. Например, ако се използва радиоимунно изследване (RIA), следва да бъдат докладвани процедурата на RIA, източникът на комплекти за RIA, сроковете на годност на комплектите, процедурата за сцинтилационно броене, както и дейности по стандартизация.

Резултати

- Ежедневни наблюдения за всяко животно по време на дозиране, включително:
- Телесно тегло (с точност до 0,1 g)
- Клинични признаци (ако има такива),
- Всяко измерване или бележки относно консумацията на храни.
- Бележки от аутопсията за всяко животно, включително:

▼ **M5**

- Дата на аутопсията,
- Третирана група на животното,
- ID на животното,
- Просектор,
- Време от деня, през което са извършени аутопсията и дисекцията,
- Възраст на животното,
- Крайно телесно тегло при аутопсия, с отбелязване на всички статистически значими увеличавания или намалявания,
- Ред на обезкръвяване и дисекция на животните при аутопсията,
- Тегло на петте прицелни андрогенно зависими тъкани:
- Вентрален дял на простатата (с точност до 0,1 mg)
- Семенни мехурчета плюс коагулиращите жлези, включително течността (по двойки, с точност до 0,1 mg)
- комплекс анален повдигач и луковичнопещерист мускул (с точност до 0,1 mg)
- Жлези на Каупър (свежо тегло — по двойки, с точност до 0,1 mg).
- Главичка на пениса (свежо тегло, с точност до 0,1 mg)
- Тегла на тъкани, измерени по избор, ако са измерени:
- Черен дроб (с точност до 0,1 g)
- Бъбрек (по двойки, с точност до 0,1 mg)
- Надбъбречна жлеза (по двойки, с точност до 0,1 mg)
- Общи бележки и коментари
- Анализи на серумни хормони, ако са извършени.
 - Серумен LH (по избор — ng/ml серум), и
 - Серумен T (по избор — ng/ml серум)
- Общи бележки и коментари

Обобщаване на данните

Данните следва да се обобщят в таблична форма, съдържаща размера на извадката за всяка група, средната стойност и стандартната грешка в средната стойност или стандартното отклонение. Таблиците следва да включват телесни тегла при аутопсия, изменения в телесното тегло от началото на дозирането до аутопсията, тегла на прицелните спомогателни тъкани от половата система и всякакви други тегла на органи, измерени по избор.

*Обсъждане на резултатите***Анализ на резултатите**

59. Теглата на тялото и органите при аутопсия следва да бъдат статистически анализирани за характеристики, като например хомогенност на дисперсията, с подходящи трансформации на данни, ако е необходимо. Третираните групи следва да бъдат сравнени с контролна група, с използване на техники като ANOVA, следвани от сравняване по двойки (напр. изпитването на Dunnett с едностранна критична област) и критерият за статистическо различие, например, $p \leq 0,05$. Тези групи, за които е постигната статистическа значимост, трябва да бъдат идентифицирани. „Относителни тегла на органи“ обаче следва да се избягват, поради невалидността на статистическите допускания, които са в основата на тази обработка на данните.

▼ M5

60. За андрогенен агонизъм контролата следва да бъде изпитваната група само на носител. Характеристиките на начина на действие на даден изпитван химикал могат да доведат до различни относителни отговори при различните тъкани, например тренболон, който не може да бъде 5α -редуциран, има по-силно изразени ефекти върху LABC и GP, отколкото TP. Статистически значимо увеличение ($p \leq 0,05$) във всеки две или повече от петте прицелни андрогенно зависими тъкани (VP, LABC, GP, CG и SVCG) следва да се счита за положителен резултат за андрогенен агонист, и всички прицелни тъкани следва да показват увеличен растеж в известна степен. Комбинираната оценка на всички отговори на спомагателни тъкани от органи от половата система (ASO) може да се постигне посредством използването на подходящ мултивариантен анализ на данните. Това би могло да подобри анализа, особено в случаите, когато само една тъкан дава статистически значим отговор.
61. За андрогенния антагонизъм контролата следва да бъде изпитваната група на референтен андроген (само тестостеронов пропионат). Характеристиките на начина на действие на даден изпитван химикал могат да доведат до различни относителни отговори сред различните тъкани, например инхибитори на 5α -редуктаза като финастерид, имат по-силно изразени ефекти във вентралния дял на простатата, отколкото в други тъкани, в сравнение с мощен антагонист на AP, като например флутамид. Статистически значимо намаление ($p \leq 0,05$) във всеки две или повече от петте прицелни андрогенно зависими тъкани (VP, LABC, GP, CG и SVCG), свързано единствено с третирането с TP, следва да се счита за положителен резултат за андрогенен антагонист, и всички прицелни тъкани следва да показват намален растеж в известна степен. Комбинираната оценка на всички отговори на спомагателни тъкани от органи от половата система може да се постигне посредством използването на подходящ мултивариантен анализ на данните. Това би могло да подобри анализа, особено в случаите, когато само една тъкан дава статистически значим отговор.
62. Данните следва да се обобщат в таблична форма, съдържаща средна стойност, стандартна грешка от средната стойност (стандартно отклонение също би било приемливо) и размер на извадката за всяка група. Трябва също да бъдат включени таблици с индивидуални данни. Индивидуалните стойности, средната стойност, средната грешка (стандартното отклонение) и стойността на коефициента на вариация за контролните данни следва да бъдат разгледани, за да се определи дали отговарят по допустим начин на критерии за съгласуваност с очаквани стойности от минали периоди. При коефициенти на вариация, които надхвърлят стойностите на CV, изброени в Таблица 1 (вж. параграфи 25 и 26), за всяко тегло на орган следва да се определи дали съществуват грешки в записването или въвеждането на данните, или дали лабораторията все още не е усвоила прецизната дисекция на андрогенно зависимите тъкани и дали е оправдано допълнително обучение/практика. Като цяло CV (стандартното отклонение, разделено на средното тегло на органа) са възпроизводими от една лаборатория в друга и от едно изследване в друго. Представените данни следва да включват най-малко: вентрален дял на простатата, семенно мехурче, анален повдигач и луковичнопещерист мускул, жлези на Каупър, главичка на пениса, черен дроб, телесно тегло и изменение на телесното тегло от началото на дозирането до аутопсията. Данните също могат да бъдат представени след корекцията на телесното тегло за ковариантност, но това не следва да замества представянето на некоригираните данни. Освен това, ако препуциумът не се отделя при някоя от групите, случаите на отделяне на препуциума следва да бъдат записани и статистически съпоставени с контролната група, с използване на точен тест на Фишер.

▼ M5

63. При проверка за сверяване на точността на въведените компютърни данни спрямо оригиналните данни, стойности за теглото на органите, които не са биологично реалистични или варират с повече от три стандартни отклонения от средните стойности на дадената третирана група, следва да бъдат внимателно проучени и може да се наложи да бъдат пренебрегнати поради вероятни грешки при записването.
64. Сравнението на резултатите от изследването с коефициенти на вариация по данни на ОИСП (в Таблица 1) често е важна стъпка в тълкуването по отношение на валидността на резултатите от изследването. Данните за минали периоди за контролните групи на носител следва да бъдат запазени в лабораторията. Данните за минали периоди за отговор на положителни референтни химикали, като ТР и FT, също следва да бъдат запазени в лабораторията. Лабораториите могат също така периодично да изпитват отговора на известни слаби андрогенни агонисти и антагонисти и да поддържат тези данни. Тези данни могат да бъдат сравнявани с наличните данни на ОИСП, за да се гарантира, че методите на лабораторията дават достатъчна статистическа прецизност и мощност.

▼ **M5***Допълнение 1***ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

Андрогенен е термин, използван за описване на положителното влияние върху растежа на андрогенно зависими тъкани.

Антиандрогенен е способността на даден химикал да потиска активността на TR в организъм на бозайник.

Химикал означава вещество или смес.

Дата на раждане е постнатален ден 0.

Доза е прилаганото количество от изпитвания химикал. При биологичното изследване на Hershberger дозата се изразява като маса на изпитвания химикал за единица телесно тегло на изпитваното животно на ден (напр. mg на kg телесно тегло дневно).

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

В терминално състояние е термин, използван за описание на състоянието на животно, което е умиращо, т.е. в близост до момента на смъртта.

Постнатален ден X е X-тият поред ден на живот след датата на раждане.

Чувствителност е способността на даден метод за изпитване за правилно идентифициране на химикали, имащи свойството, което е подложено на изпитване.

Специфичност е способността на даден метод за изпитване за правилно идентифициране на химикали, нямащи свойството, което е подложено на изпитване.

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

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

Допълнение 2

Бележка: Документ, изготвен от Секретариата на програмата относно насоките за изпитване въз основа на споразумението, постигнато на 6-тото заседание на Оперативната група по изпитване и оценка на нарушителната функция на ендокринната система

Концептуална рамка на ОИСП за изпитване и оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система

<p>Равнище 1 Сортиране и приоритизиране върху съществуваща информация</p>	<ul style="list-style-type: none"> — физични и химични свойства, напр. ММ, реактивоспособност, летливост, биоразградимост — експозиция на човека и окол. среда, напр. обем на производство, изпускания, употреби — опасност, напр. токсикологични данни на разположение
<p>Равнище 2 Изпитвания <i>in vitro</i> предоставящи механистични данни</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Афинитет за свързване към рецептор ER, AR, TR — Транскрипционно активиране — Ароматаза и стероидогенеза <i>in vitro</i> — Разпознаване/свързване към рецептор за арилов въглевод. — QSAR — предскрининг висока производителност — функция на щитовидната жлеза — изследвана хепатоцити от риби (VTG) — пруги (както е приложимо)
<p>Равнище 3 Изпитвания <i>in vivo</i> предоставящи данни за отделни ендокринни механизми и ефекти</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Утеротрофично изследване (за естрогени) — Изследване на Hershberger (за андрогени) — Хормонална функция, несвързана с хормони — Други (напр. щитовидна жлеза) — изследв. на VTG (вителогенин) от риби (за естрогени)
<p>Равнище 4 Изпитвания <i>in vivo</i> предоставящи данни за множество ендокринни механизми и ефекти</p>	<ul style="list-style-type: none"> — подобрен ОИСП 407 (крайни точки основани на ендокринни механизми) — изследвания на мъжки и женски в пубертет — изследване на невредими полово зрели мъжки — Изсл. гонадна хистопатология при риби — Изследване на метаморфоза при жаби
<p>Равнище 5 Изпитвания <i>in vivo</i> предоставящи данни за ефекти от ендокринни и други механизми</p>	<ul style="list-style-type: none"> — изследване на 1 поколение (TG415 подобр.)¹ — изследване на 2 поколения (TG416 подобр.)¹ — изп. скрининг на репродукция (TG421 подобр.)¹ — комбинирано скринингово изпитване 28 дни/репродукция (TG 422 подобр.)¹ <p>¹ Потенциални подобрения ще се разглеждат от ГУВБ</p> <ul style="list-style-type: none"> — Изследвания за частичен и пълен жизнен цикъл при риби, птици, земно-водни и безгръбначни (на развиващия се организъм и репродукция)

ГУВБ: Група за управление на валидирането при изпитване и оценка на бозайници

▼ **M5****БЕЛЕЖКИ КЪМ РАМКАТА**

- Бележка 1:* Въвеждане на всички равнища и напускане на всички равнища е възможно и зависи от естеството на съществуващите потребности от информация за целите на оценката на опасността и риска.
- Бележка 2:* На равнище 5 екотоксикологията следва да включва крайни точки, които дават показания за механизми за вредни ефекти, както и потенциални увреждания на равнище популация
- Бележка 3:* Когато даден мултимодален модел покрива няколко от отделните изследвания на крайни точки, този модел следва да замени използването на тези изследвания на крайни точки
- Бележка 4:* Оценката на всеки химикал следва да се извършва въз основа на всеки отделен случай, като се взема предвид цялата достъпна информация и като се отчита функцията на равнищата на рамката.
- Бележка 5:* Към настоящия момент рамката не следва да се счита за всеобхватна. На равнища 3, 4 и 5 тя включва изследвания, които или са налични, или по отношение на тях е в ход валидиране. Що се отнася до последните, те са включени временно. След като бъдат разработени и валидирани, те ще бъдат официално добавени към рамката.
- Бележка 6:* Равнище 5 не следва да се разглежда като включващо само окончателни изпитвания. Счита се, че изпитванията, включени на това равнище, допринасят за общата оценка на опасността и риска.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.
- (3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.
- (4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment № 62. ENV/JM/MONO(2006)30.
- (5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5 α -Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment № 86. ENV/JM/MONO(2008)3.
- (6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment № 73. ENV/JM/MONO(2007)20.
- (7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269.

▼ M5

- (8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. *Environ Health Perspect.* 115(5):671-8.
- (9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. *Biochem J*26:413-422.
- (10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. *Biochem J*26:1306-1314.
- (11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. *J Pharmacol Exp Therap* 99:38-44.
- (12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for myotrophic activity. *Endocrinology* 45:113-119.
- (13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc Soc Exp Biol Med* 83:175-180.
- (14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). *Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic.* Washington DC: United States Public Health Service.
- (15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: *Methods in Hormone Research, volume IIA.* (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151-220.
- (16) Massaro EJ (2002). *Handbook of Neurotoxicology, volume I.* New York: Humana Press, p 38.
- (17) OECD (2000). Ръководство относно признаването, оценяването и използването на клинични признаци като хуманен край за опитни животни, използвани за оценка на безопасността. *Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 19.* ENV/JM/MONO(2000)7.
- (18) OECD (1982). *Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice,* ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- (19) OECD (2008). *Acute oral toxicity — up-and-down procedure.* OECD Guideline for the testing of chemicals № 425.
- (20) OECD (2001). *Guidance document on acute oral toxicity.* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- (21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: <http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf>.
- (22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rmdmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html.
- (23) OECD (2008). *Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay.* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 90. ENV/JM/MONO(2008)17.
- (24) OECD (2008). *Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.*
- (25) OECD (2009). *Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties.* Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼ M5

- (26) 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).
- (27) Следните глави от настоящото приложение:
 - Б.1А. Остра орална токсичност — процедура с фиксирани дози
 - Б.1Б. Остра орална токсичност — метод клас остра токсичност

▼ M5

Б.56 РАЗШИРЕНО ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ЗА РЕПРОДУКЦИЯТА В ЕДНО ПОКОЛЕНИЕ

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 443 (2012). Той се основава на предложение на Международния институт за науките за живота (ILSI)-Институт по науките за здравето и околната среда (HESI) и Техническият комитет по оценка на безопасността на агрохимикалите (ACSA) за разширено изследване относно репродукцията в едно поколение в жизнен стадий „първо поред поколение“ (F₁), публикувано в Coorper et al., 2006 (1). В планирането на изследването са направени някои подобрения и разяснения, за да се предостави гъвкавост и да се подчертае важноста на започването от съществуващите знания, като се използват интравитални наблюдения, които да насочват и приспособяват изпитването. Настоящият метод за изпитване обхваща подробно описание на оперативното извършване на разширено изследване за токсичност за репродукцията в едно поколение. Настоящият метод за изпитване описва три кохорти животни от първо поред поколение (животни от F₁):

Кохорта 1: оценява крайните точки за репродукцията/развиващия се организъм; тази кохорта може да се разшири с оглед да обхване поколение F₂ (второ поред поколение).

Кохорта 2: оценява потенциалното въздействие от експозицията на химикала върху нервната система на развиващия се организъм.

Кохорта 3: оценява потенциалното въздействие от експозицията на химикала върху имунната система на развиващия се организъм.

2. Решенията за това дали да се направи оценка на второто поред поколение и да се пропусне кохортата за токсичност за нервната система на развиващия се организъм и/или кохортата за токсичност за имунната система на развиващия се организъм, следва да отразяват съществуващите познания за подлагания на оценка химикал, както и нуждите на различните регулаторни органи. Целта на метода за изпитване е да предостави подробности за това как може да се извърши изследването и да засегне въпроса как би следвало да бъде оценявана всяка кохорта.
3. Процедурата за решение относно вътрешно задействане с оглед производство на 2-ро поколение е описана в Ръководство № 117 на ОИСП (39) за онези регулаторни органи, които използват условия за вътрешно задействане.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ЦЕЛИ

4. Основната цел на разширеното изследване за токсичност за репродукцията в едно поколение е да оцени специфични жизнени стадии, които не са обхванати от други видове изследвания за токсичност, и извърши изпитване за ефекти, които могат да се проявят в резултат на пренатална и постнатална експозиция на химикали. За крайни точки за репродукцията се предвижда като първа стъпка, и когато има в наличност информация от проучвания с повтаряща се доза (включително скринингови изследвания на токсичност за репродукцията, напр. OECD TG 422 (32), или краткосрочни скринингови изследвания за нарушители на функциите на ендокринната система (например утеротрофично изследване — метод за изпитване B.54 (36)) и изследване на Hershberger — метод за изпитване B.55 (37), същата да се използва за откриване на ефекти върху репродуктивните органи на мъжки и женски животни. Това може да включва сперматогенеза (хистопатология на тестисите) за мъжките, и естрални цикли, брой фоликули/зрееене на овоцити и цялостност (хистопатология) на яйчниците за женските животни. Впоследствие разширеното изследване за токсичност за репродукцията в едно поколение служи за изпитване за крайните точки за репродуктивността, които се нуждаят от взаимодействие на мъжки с женски животни, на женски животни с плода, на женски животни с поколениято, и поколение F₁ след полово зрялост (виж Ръководство № 151 на ОИСП в подкрепа на настоящия метод за изпитване (40).

▼ M5

5. Настоящият метод за изпитване е проектиран да предостави оценка на ефектите на химикали върху пренаталното и постнаталното развитие, както и задълбочена оценка на системната токсичност при бременни и кърмещи женски и младо и полово зряло поколение. От подробното проучване на крайните точки за развиващия се организъм, като например жизнеспособност на потомството, здравословно състояние на новородените, статус на развиващия се организъм при раждане и физическо и функционално развитие до достигане на полово зрялост, се очаква да идентифицира конкретни прицелни органи при потомството. Освен това проучването ще предостави и/или потвърди информация за ефектите на изпитвания химикал върху целостта и функционирането на репродуктивната система при полово зрели мъжки и женски животни. Взети са предвид по-специално, но не само, следните параметри: функция на гонадите, естрален цикъл, зреене на сперматозоидите от епидидима, поведение при чифтосване, зачеване, бременност, раждане и кърмене. Освен това информацията, получена от оценките за невротоксичност и имунотоксичност за развиващия се организъм, ще характеризира потенциалните ефекти върху тези системи. Данните, получени от тези изпитвания, следва да позволят определянето на нивата без наблюдаван неблагоприятен ефект (NOAEL), най-ниските дози, при които се наблюдава неблагоприятен ефект (LOAEL), и/или еталонните дози за различните крайни точки и/или да бъдат използвани за охарактеризиране на ефектите, открити в предишни проучвания с повтаряща се доза и/или да служат като ръководство за последващи изпитвания.
6. На фигура 1 е показан схематичен чертеж на протокола. Изпитваният химикал се прилага непрекъснато в постепенни дози на няколко групи полово зрели мъжки и женски животни. Това родителско поколение (P) се дозира за определен период преди чифтосването (избран въз основа на наличната информация за изпитвания химикал; но в продължение на най-малко две седмици) и в продължение на двуседмичен период на чифтосване. Мъжките от P се третират впоследствие най-малко до отбиването на F₁. Те трябва да се третират в продължение на най-малко 10 седмици. Те могат да бъдат третирани за по-дълъг период, ако има нужда от изясняване на ефектите върху репродукцията. Третирането на женските животни от P продължава по време на бременността и кърменето до прекратяването след отбиване на котилата им (т.е. третиране за период от 8—10 седмици). Поколението F₁ се третира по-нататък с изпитвания химикал от отбиването до навършване на полово зрялост. Ако се оценява второ поколение (виж Ръководство № 117 на ОИСП (39), третирането на потомството от F₁ се запазва до отбиването на F₂, или до прекратяване на изследването.
7. При всички животни се провежда клинично наблюдение и патологоанатомично изследване за установяване на признаци на токсичност, като особено внимание се обръща върху състоянието и функцията на мъжката и женската репродуктивна система и върху здравословното състояние, растежа и развитието на потомството. При отбиване, избрани потомства се разпределят към конкретни подгрупи (кохорти 1—3, вж. параграфи 33 и 34 и фигура 1) за допълнителни проучвания, включително полово съзряване, цялост и функциониране на репродуктивните органи, неврологични и поведенчески крайни точки и имунни функции.
8. При провеждане на изследването следва да бъдат спазвани 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 (34).

▼ M5

9. Когато са на разположение достатъчен брой изследвания, за да се установи въздействието на този нов план за изследване, методът за изпитване ще бъде прегледан и, ако е необходимо, преразгледан в светлината на придобития опит.

Фигура 1

Схема на разширеното изследване за токсичност за репродукцията в едно поколение



@ по едно от котило и представителни за общо 20 котила където е възможно

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА/ПОДГОТОВКАТА ЗА ИЗПИТВАНЕТО

Животни*Избор на вида и породата на животните*

10. Изборът на видовете за изпитването за токсичност за репродукцията трябва да бъде внимателно обмислено в съответствие с цялата налична информация. Поради количеството съпътстващи данни и съпоставимостта с изпитванията за обща токсичност обаче плъховете обичайно са предпочитаният вид, и критериите и препоръките, дадени при настоящия метод за изпитване, се отнасят за този вид. Използването на друг животински вид трябва да се обоснове и в тези случаи се налага да се внесат съответни модификации в протокола. Не трябва да се използват породи с ниска плодовитост или породи, за които е характерна висока честота на спонтанните вродени аномалии.

Възраст, телесно тегло и критерии за включване

11. Като родители трябва да се използват здрави животни, които в миналото не са били подлагани на опитни процедури. Следва да бъдат изследвани мъжки и женски животни, като женските индивиди следва да не са раждали и да не са бременни. Животните от поколение Р трябва да бъдат в полова зрялост, със сходно тегло в началото на дозирането (в рамките на съответния пол), на подобна възраст (около 90 дни) при чифтосването, и представителни за изследваните вид и порода. Животните следва да бъдат аклиматизирани в продължение на поне 5 дни след пристигането им. Животните се разпределят на случаен принцип към контролните и третираните групи, по начин, който води до съпоставими между групите стойности на средното телесно тегло (т.е. ± 20 % от средната стойност).

▼ M5

Условия на отглеждане и хранене

12. Температурата в стаята на опитните животни трябва да бъде 22 °C (\pm 3 °C). Относителната влажност следва да бъде между 30 и 70 %, с идеален обхват от 50—60 %. Изкуственото осветление следва да бъде настроено на 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. Уместно е да се използват конвенционални лабораторни храни при неограничено количество вода за пиене. Особено внимание следва да се обърне на съдържанието на фитоестрогени в хранителния режим, тъй като високото равнище на фитоестрогени в хранителния режим може да засегне някои крайни точки на репродукцията. Препоръчват се стандартизирани хранителни режими със свободна рецептура, в които естрогенните химикали са намалени (2)(30). 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. Трябва да бъдат проверени съдържанието, хомогенността и стабилността на изпитвания химикал в хранителния режим. Храната и водата за пиене следва да бъдат редовно анализирани за наличието на замърсители. Проби от всяка партида хранителен режим, използван по време на изпитването, следва да се съхранят при подходящи условия (напр. замразени при температура — 20 °C), до приключването на доклада, в случай че резултатите се нуждаят от допълнителен анализ на съставките на хранителния режим.
13. Животните се настаняват в клетки в малки групи от един и същ пол и третирана група. Те могат да бъдат отглеждани в индивидуални клетки, за да се избегнат евентуалните наранявания (напр. мъжки след периода на чифтосването). Чифтосването трябва да се извършва в клетки, подходящи за тази цел. След като се открият доказателства за копулация женските, за които се предполага, че са бременни, се настаняват отделно в клетки за раждане или майчинство, където им се предоставят подходящи гнездови материали. Котилата се отглеждат с майките им до отбиването. Животните от F₁ се отглеждат в малки групи от един и същ пол и третирана група от отбиването до прекратяването на изследването. Ако това е научно обосновано, животните могат да бъдат отглеждани отделно. Нивото на фитоестрогени, съдържащи се в избраните материали за постилане, следва да бъде минимално.

Брой и идентифициране на животните

14. Обикновено всяка изпитвана и контролна група трябва да се състои от достатъчен брой чифтосващи се двойки за достигане на най-малко 20 бременни женски животни за подложена на дадена доза група. Целта е да се получат достатъчно на брой бременности, за да се осигури съдържателна оценка на потенциала на химикала да влияе върху плодовитостта, бременността и майчиното поведение при животните от поколение P, както и върху растежа и развитието на потомството от F₁ от зачеването до зрелостта. Недостигането на желания брой бременни животни не означава непременно, че изследването е невалидно, и следва да се оценява за всеки отделен случай, като се има предвид евентуална причинно-следствена връзка с изпитвания химикал.
15. На всяко животно от P се дава уникален идентификационен номер, преди да започне дозирането. Ако лабораторните данни от минали периоди сочат, че е възможно значителен дял женски индивиди да не покажат редовни естрални цикли (4 или 5 дни), тогава преди началото на третирането се препоръчва оценка на естралните цикли. Като алтернатива, размерът на групата може да бъде увеличен, за да се гарантира, че поне 20 женски животни във всяка група ще имат редовни естрални цикли (4 или 5 дни) в началото на третирането. Цялото потомство от F₁ се идентифицира индивидуално при първия преглед на новородените през постнатален ден (ПНД) 0 или 1. В документацията трябва да се обозначи от кое котило произлиза всяко животно от F₁ и, където е приложимо, от F₂, по време на цялото изследване.

▼ M5

Изпитван химикал*Налична информация за изпитвания химикал*

16. Прегледът на съществуващата информация е важен за решенията относно пътя на въвеждане, избора на носител, избора на животински вид, избора на дозирането и евентуалните изменения в графика за дозиране. Следователно цялата налична относима информация за изпитвания химикал, т.е. физични, химични, токсикокинетични (включително специфичен за вида метаболизъм), токсикодинамични свойства, зависимости структура-активност (SAR), метаболитни процеси *in vitro*, резултати от предходни изследвания за токсичност и относима информация за структурни аналози следва да бъде взета предвид при планирането на разширеното изследване за токсичност за репродукцията в едно поколение. Предварителна информация за абсорбцията, разпределението, метаболизма, екскрецията (APME) и биоаккумуляцията може да се получи от химичната структура, физичните и химичните данни, обхвата на изследванията на свързането с плазмени протеини или токсикокинетиката (ТК), а резултати от изследванията за токсичност дават допълнителна информация, например относно NOAEL, метаболизма или метаболитната индукция.

Вземане предвид на токсикокинетични данни

17. Въпреки че не се изискват, данните за ТК от извършени в миналото изследвания за определяне на обхвата или други изследвания са изключително полезни при изготвянето на плана на изследването, избирането на нивата на доза и тълкуването на резултатите. От особена полза са данни, които: 1) служат за проверка на експозицията на изпитвания химикал (или относимите метаболити) на развиващите се зародиши и на новородените, 2) предоставят приблизителна оценка на вътрешната дозиметрия, и 3) служат за оценка на потенциално насищане на кинетичните процеси в зависимост от дозата. Допълнителни данни за ТК, като например метаболитни профили, изменение на концентрацията във времето и т.н. също трябва да бъдат взети под внимание, ако са налични. Допълнителни данни за ТК могат също да се съберат по време на основното изследване, при условие че това не пречи на събирането и тълкуването на крайните точки на основното изследване.

Като обща насока, следният набор от данни за ТК биха били от полза за планиране на разширеното изследване за токсичност за репродукцията в едно поколение:

- Късна бременност (*например*, ден 20 от бременността) — кръв от майката и от плода
- Среда на периода на кърмене (ПНД 10) — кръв от майката и от новороденото и/или мляко
- Ранен период след отбиването (*напр.* ПНД 28) — кръвни проби от отбитото животно

Следва да се прилага гъвкавост при определяне на конкретните определяеми компоненти (*напр.* изходният химикал и/или метаболитите) и схема за вземане на проби. Например, броят на взетите проби и графикът за пробовземане в даден ден ще зависят от пътя на експозиция и предварителното познаване на токсикокинетичните свойства при животни, които не са бременни. За изследвания на хранителни режими пробовземането последователно по едно и също време през всеки от тези дни е достатъчно, докато при дозирането през сонда може да доведе до необходимост от допълнителни времена на пробовземане, за да се получи по-добра приблизителна оценка на обхвата от вътрешни дози. Не е необходимо обаче да се покрива цялото изменение на концентрацията във времето в един отделен ден за пробовземане. Ако е необходимо, кръвта може да се обедини по пол в рамките на дадено котило за анализите на плода и новородените.

▼ **M5***Път на прилагане*

18. Изборът на път следва да отчита пътя или пътищата, които са относими в най-голяма степен към експозицията на човека. Въпреки че протоколът е проектиран за прилагане на изпитвания химикал чрез хранителен режим, той може да се модифицира за прилагане по други пътища (питейна вода, сонда, вдишване, през кожата), в зависимост от характеристиките на химикала и изискваната информация.

Избор на носител

19. 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). Когато се използват други носители освен водата, трябва да се познаят токсикологичните свойства на носителю. Използването на носители с потенциална действителна токсичност трябва да се избягва (напр. ацетон, диметилсулфоксид). Трябва да бъде определена стабилността на изпитвания химикал в носителю. Когато за улесняване на дозирането се използва носител или друга добавка, следва да се вземат предвид следните характеристики: 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 ефекти върху консумирането на храна или вода, или хранителния статус на животните.

Избор на доза

20. Обикновено изследването трябва да включва поне три нива на доза и една паралелна контрола. При избора на подходящи нива на доза, изследователят трябва да вземе под внимание цялата налична информация, включително информация за дозиране от предходни изследвания, данни от ТК от бременни животни и от животни, които не са бременни, степен на прехвърляне чрез млякото, и приблизителна оценка на експозицията на човека. Ако има налични данни от ТК, които показват насищане на кинетичните процеси в зависимост от дозата, следва да се положат грижи да се избегнат високи нива на доза, които ясно демонстрират насищане, при условие, разбира се, че се очаква експозицията на човека да е доста под точката на насищане. В такива случаи най-високото ниво на доза трябва да бъде на инфлексната точка за преминаване към нелинейно ТК поведение, или съвсем малко над нея.
21. В отсъствието на относими данни от ТК, нивата на доза следва да се основават на токсичните ефекти, освен ако няма ограничение, свързано с физическите и химическите свойства на изпитвания химикал. Ако нивата на доза се основават на токсичност, най-високата доза следва да бъде подбрана така, че да предизвика някаква системна токсичност, но не смърт или тежко страдание на животните.
22. Следва да се подберат нива на доза в намаляваща последователност с цел установяване на всеки един ефект, свързан с дозата, както и да се установят NOAEL или дозите в близост до границата на откриване, с което ще се даде възможност за определяне на еталонна доза за най-чувствителната крайна точка или точки. Често двукратните или четирикратните интервали са оптимални с оглед избягване на големи интервали на дозите между NOAEL и LOAEL. Добавянето на четвърта изпитвана група често е за предпочитане пред използването на много голям интервал (напр. повече от 10-кратен) между дозите.
23. С изключение на третиране с изпитвания химикал, животните в контролната група се отглеждат по начин, идентичен на този при животните от изпитвана група. Животните от тази група следва да не се третират, или да им се провежда фиктивно третиране, или това да е контролна група на носител, когато се използва такъв прилагането на изпитвания химикал. Когато се използва носител, той следва да се въвежда на животните от контролната група в най-голямото използвано количество.

▼ M5

Изпитване при пределна концентрация

24. Ако при изследвания с повтаряща се доза няма показания за токсичност при доза от поне 1 000 mg/kg телесно тегло/ден, или ако не се очаква токсичност, изхождайки от данните за структурно и/или метаболитно свързани химикали, показващи сходство в метаболитните свойства *in vivo/in vitro*, може да не е необходимо изследване, използващо няколко нива на доза. В такива случаи разширеното изпитване за токсичност за репродукцията в едно поколение може да се извърши с използване на контролна група и еднократна доза от поне 1 000 mg/kg телесно тегло/ден. Ако обаче при тази пределна доза бъдат намерени доказателства за токсичност за репродукцията или за развиващия се организъм, за идентифицирането на NOAEL ще са необходими допълнителни изследвания при по-ниски нива на доза. Тези съображения за изпитване при пределна концентрация се прилагат само когато експозицията на човека не показва необходимостта от по-високо ниво на доза.

ПРОЦЕДУРИ

Експозиция на потомството

25. Експозицията чрез хранителния режим е предпочитаният метод за прилагане. При изследване чрез сонда следва да се отбележи, че новородените обикновено са експонирани на изпитвания химикал само индиректно чрез майчиното мляко до отбиването им, когато за тях започва директното дозиране. При изследване чрез хранителния режим или питейната вода новородените получават допълнително изпитвания химикал и директно, когато започнат да се хранят самостоятелно през последната седмица от периода на кърмене. Следва да бъдат разгледани изменения на плана на изследването, ако екскрецията на изпитвания химикал чрез млякото е слаба и когато липсват доказателства за непрекъсната експозиция на потомството. В тези случаи следва да се разгледа директно дозиране през периода на кърмене въз основа на наличната информация за ТК, токсичността за потомството или измененията в биомаркерите (3)(4). Преди провеждането на изследвания за директно дозиране на новородени в периода на кърмене следва внимателно да се разгледат предимствата и недостатъците (5).

График на дозирането и прилагане на дозите

26. Известна информация за естралния цикъл, хистопатологията на мъжката и женската репродуктивна система и анализа на състоянието на сперматозоидите от тестисите/епидидима може да е налична от предходни изследвания за токсичност с повтаряща се доза с подходяща продължителност. Следователно продължителността на третирането през времето преди чифтосването в разширеното изпитване за токсичност за репродукцията в едно поколение е насочена към откриване на ефектите върху функционалните промени, които могат да попречат на поведението при чифтосване и на оплождането. Третирането през времето преди чифтосването следва да бъде достатъчно дълго, за да се постигнат условия на стационарно състояние при експозиция на мъжките и женските животни от Р. В повечето случаи 2-седмично третиране през времето преди чифтосването и за двата пола се счита за подходящо. За женските това обхваща 3-4 пълни естрални цикъла и следва да е достатъчно за откриване на всякакви неблагоприятни ефекти върху цикличността. За мъжките това се равнява на времето, необходимо за преминаването на узряващите сперматозоиди през епидидима и следва да позволява откриване на пост-тестикуларни ефекти върху сперматозоидите (през последните етапи от напускането на клетките на Сертоли и узряването на сперматозоидите в епидидима) при чифтосване. Към момента на прекратяване, когато по график са планирани хистологията на тестисите и епидидима и анализът на параметрите за оценка на състоянието на сперматозоидите, мъжките от Р и F₁ вече ще са били експонирани в продължение най-малко на един процес на сперматогенеза ((6)(7)(8)(9) и Ръководство № 151 на ОИСП (40)).

▼ M5

27. Сценариите на експозиция през времето преди чифтосването за мъжките животни могат да бъдат адаптирани, ако в предходни изследвания са били ясно показани тестикуларна токсичност (нарушаване на сперматогенезата) или ефекти върху целостта и функционирането на сперматозоидите. По подобен начин, за женските животни, известни въздействия на изпитвания химикал върху естралния цикъл и следователно върху способността за чифтосване, могат да оправдаят различни сценарии на експозиция през времето преди чифтосването. В специални случаи може да се допусне третиране на женски животни от Р да започне само след получаване на положителна натривка за сперматозоиди (вж. Ръководство № 151 на ОИСП (40)).
28. След като е установен периодът на дозиране през времето преди чифтосването, животните следва да бъдат третирани с изпитвания химикал непрекъснато 7 дни в седмицата до аутопсията. Дозирането на всички животни трябва да се извършва по един и същ метод. Дозирането следва да продължи по време на 2-седмичния период на чифтосване, а за женски животни от Р — по време на бременността и кърменето до деня на прекратяване след отбиването. Мъжките животни трябва да бъдат третирани по същия начин до прекратяването в момента, в който животните от F₁ бъдат отбити. За аутопсия следва да се дава приоритет на женски животни, които следва да бъдат подложени на аутопсия на същия/подобен ден от периода на кърмене. Аутопсията на мъжки може да се разпростре върху по-голям брой дни в зависимост от лабораторните съоръжения. Освен ако вече е започнато през периода на кърмене, директното дозиране на избраните мъжки и женски животни от F₁ следва да започне при отбиването и да продължи до деня на аутопсията по график, в зависимост от разпределението на кохортата.
29. За химикали, които се прилагат чрез хранителен режим или вода за пиене, е важно да се гарантира, че количеството изпитван химикал не пречи на 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.
30. Когато изпитваният химикал се прилага чрез сонда, обемът на течността, приложен наведнъж, обикновено не следва да превишава 1 ml/100 g телесно тегло (0,4 ml/100 g телесно тегло е максималната стойност за масло, *напр.* царевично масло). Варирането в обема трябва да бъде сведено до минимум, като концентрацията се приспособи с оглед гарантиране на постоянен обем при всички нива на доза, с изключение на химикали с дразнещо или корозивно действие, тъй като ефектът им обикновено се засилва при по-високи концентрации. Третирането следва да се прилага по едно и също време всеки ден. Дозата за всяко животно следва обикновено да се основава на най-актуалното измерване на индивидуалното телесно тегло и да се коригира най-малко веднъж в седмицата при полово зрели мъжки и полово зрели женски, които не са бременни, и на всеки два дни при бременните женски и животните от F₁, когато се прилага преди отбиването и в продължение на 2-те седмици след отбиването. Ако данни от ТК сочат слабо преминаване на изпитвания химикал през плацентата, може да се наложи дозата през сонда през последната седмица на бременността да бъде коригирана, за да се предотврати прилагането на прекалено токсична доза за майката. В деня на раждането женските индивиди следва да не бъдат третирани със сонда или по друг начин, изискващ манипулиране с животното; пропускането на прилагането на изпитвания химикал през този ден е за предпочитане пред смущаването на процеса на раждане.

▼ M5

Чифтосване

31. Всяка женско животно от Р трябва да бъде поставено с едно избрано на случаен принцип и несвързано с него мъжко животно от същата група на определена доза (чифтосване 1:1) докато бъдат наблюдавани доказателства за копулация или до изтичането на 2-седмичен срок. Ако няма достатъчно мъжки, например поради смъртност при мъжките преди чифтосването, тогава мъжко животно (или животни), което вече е било чифтосвано, може да бъде чифтосано (1:1) с второ женско животно (или животни), така че всички женски животни да бъдат чифтосани. Денят, в който се установи доказателство за чифтосване (наличие на вагинална запушалка или сперматозоиди), се определя като ден 0 от бременността. Животните следва да бъдат разделени възможно най-скоро след наблюдаването на доказателства за копулация. Ако не е извършено чифтосване след 2 седмици, животните следва да бъдат разделени без допълнителна възможност за чифтосване. Животните от всяка двойка, определена за чифтосване, трябва да бъдат ясно идентифицирани в данните от изпитването.

Брой на животните в котилото

32. През ден 4 след раждането броят на животните във всяко котило може да бъде коригиран посредством елиминиране на излишните новородени животни чрез подбор на случаен принцип, за да се получат, колкото е възможно по-точно, пет мъжки и пет женски животни в котило. Избирателното елиминиране на новородени животни, например въз основа на телесно тегло, не е уместно. Когато броят на мъжките или женските новородени животни не дава възможност да се получат по пет животни от пол за котило, приемлива е частична корекция (например, шест мъжки и четири женски животни).

Подбор на новородени за изследвания след отбиването (вж. фигура 1)

33. В деня на отбиването (около ПНД 21) до 20 новородени за доза и за контролна група се подбират от всички налични котила за допълнителни проучвания, и се съхраняват до полово съзряване (освен ако не се изисква провеждане на изпитване на по-ранен етап). Новородените се избират на случаен принцип, с изключение на това, че очевидно малорасли животни (животни с телесно тегло повече от две стандартни отклонения под средното тегло на новородените от съответното котило) следва да не бъдат включвани, тъй като е малко вероятно те да са представителни за третираната група.

През ПНД 21 избраните новородени от F₁ се разпределят на случаен принцип в една от трите кохорти животни, както следва:

Кохорта 1 (1А и 1Б) = изпитване за токсичност за репродукцията/за развиващия се организъм

Кохорта 2 (2А и 2Б) = изпитване за невротоксичност за развиващия се организъм

Кохорта 3 = изпитване за имунотоксичност за развиващия се организъм

Кохорта 1А: Едно мъжко и едно женско животно от котило на група (20/пол/група): приоритетен подбор за първична оценка на ефектите върху репродуктивните системи и на общата токсичност.

Кохорта 1Б: Едно мъжко и едно женско животно от котило на група (20/пол/група): приоритетен подбор за последваща оценка на репродуктивността чрез чифтосване на животни от F₁, когато се оценяват (вж. Ръководство № 117 на ОИСР (39)), и за получаване на допълнителни хистопатологични данни в случаи на предполагаеми токсични за репродукцията химикали или нарушители на функциите на ендокринната система, или когато резултатите от кохорта 1А са неясни.

Кохорта 2А: Общо 20 новородени от група (10 мъжки и 10 женски животни от група; едно мъжко или едно женско от котило) за невроповеденческо изпитване, последвано от оценка на неврохистопатологията като полово зрели животни.

Кохорта 2Б: Общо 20 новородени от група (10 мъжки и 10 женски животни от група; едно мъжко или едно женско от котило) за оценка на неврохистопатологията при отбиване (ПНД 21 или ПНД 22). Ако няма достатъчен брой животни, следва да се отдава предпочитание на разпределението на животни към Кохорта 2А.

▼ M5

Кохорта 3: Общо 20 новородени от група (10 мъжки и 10 женски животни от група; едно от котило, където е възможно). Възможно е да са необходими допълнителен брой новородени от контролната група, за да послужат като животни за положителни контроли в изследването за зависимост от Т-клетки отговор чрез образуване на антитела (TDAR) през ПНД 56 ± 3 .

34. Ако няма достатъчен брой новородени в дадено котило, които да служат за всички кохорти, с предимство се ползва Кохорта 1, тъй като тя може да бъде разширена за производство на поколение F₂. Допълнителни новородени могат да бъдат разпределени в някоя от кохортите в случай на специфични опасения, например ако за даден химикал се предполага, че е невротоксичен, имунотоксичен или токсичен за репродукцията. Тези новородени могат да бъдат използвани за изследвания на различни времеви точки или за оценка на допълнителни крайни точки. Новородени, които не са разпределени по кохорти, се предоставят за клинична биохимия (параграф 55) и макроскопска аутопсия (параграф 68).

Второ чифтосване на животните от поколение P

35. Второ чифтосване обикновено не се препоръчва за животните от поколение P, тъй като то се извършва за сметка на загуба на важна информация за броя на местата на имплантация (и по този начин на данни за пост-имплантацията и перинаталните загуби, показатели за евентуален тератогенен потенциал) за първото котило. Необходимостта от проверка или изясняване на ефекта върху експонираните женски би била удовлетворена по-добре чрез разширяване на обхвата на изследването с оглед включване на чифтосването на поколение F₁. Второ чифтосване на мъжки животни от P с нетретирани женски обаче винаги е възможен вариант за изясняване на неясни находки или за по-нататъшно характеризиране на ефектите върху плодовитостта, наблюдавани при първото чифтосване.

ИНТРАВИТАЛНИ НАБЛЮДЕНИЯ

Клинични наблюдения

36. На животните от P и избраните животни от F₁ веднъж дневно се извършва общо клинично наблюдение. В случай на дозиране чрез сонда клиничните наблюдения следва да бъдат извършвани преди и след дозирането (за възможни признаци на токсичност, свързани с върхова концентрация в плазмата). Трябва да се запишат съответните изменения в поведението, признаците на трудно или удължено раждане, както и всички признаци на токсичност. Наблюдаването на всички животни за наличие на силна токсичност, заболяемост и смъртност се извършва два пъти дневно, а през двата неработни дни в края на седмицата — веднъж дневно.
37. В допълнение веднъж седмично се извършва по-задълбочен преглед на всички животни от P и F₁ (след отбиването), като извършването би било удобно при претегляне на животното, което би свело до минимум стреса от манипулирането. Наблюденията следва да се провеждат и описват внимателно, с използване на точкови системи, определени от лабораторията, извършваща изпитванията. Трябва да бъде направено усилие да се осигурят минимални колебания в условията на изпитването. Отбелязваните признаци следва да включват промяна в кожата, козината, очите, лигавиците, поява на секреция и екскреция, както и автономна активност (напр. сълзене, пилоерекция, промяна в големината на зениците, необичаен начин на дишане), без да се ограничават до това. 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 самоосакаляване, вървене назад).

▼ **M5****Телесно тегло и консумация на храна/вода**

38. Животните от Р се претеглят на първия ден от дозирането, а след това най-малко веднъж седмично. В допълнение, женските животни от Р се претеглят по време на кърменето в същите дни, когато се претеглят новородените в техните котила (вж. параграф 44). Всички животни от F₁ се претеглят индивидуално при отбиване (ПНД 21) и поне веднъж седмично след това. Телесно тегло се записва също така в деня, в който те достигнат пубертет (приключване на отделянето на препуциума или настъпване на отвореното състояние на вагината). Всички животни се претеглят при умъртвяването.
39. По време на изследването консумацията на храна и вода (в случай на прилагане на изпитвания химикал чрез питейната вода) се записва поне веднъж седмично в същите дни, в които се измерва телесното тегло на животните (с изключение на времето на съвместно обитаване). Консумацията на храна във всяка клетка с животни от F₁ се записва всяка седмица, като се започва от разпределянето в съответната кохорта.

Естрални цикли

40. Предварителна информация относно свързани с изпитвания химикал ефекти върху естралния цикъл може вече да е налична от предходни изследвания за токсичност с повтаряща се доза, и може да се използва при планирането на специфичен за изпитвания химикал протокол за разширеното изпитване за токсичност за репродукцията в едно поколение. Обикновено оценката на естралната цикличност (чрез вагинална цитология) започва в началото на периода на третиране и продължава до потвърждение на чифтосването или до края на 2-седмичния период на чифтосване. Ако женските животни са били проверени за нормален естрален цикъл преди третирането, тогава е полезно натривките да продължат след започване на третирането, но в случай че възникне съмнение относно неспецифични ефекти в началото на третирането (като например първоначално явно намаляване на консумацията на храна) на животните може да се позволи приспособяване към третирането за период до две седмици преди началото на 2-седмичния период с натривки, водещ до чифтосване. Ако периодът на третиране на женските е удължен по този начин (т.е. 4-седмично третиране преди чифтосването), следва да бъде разгледано закупуване на животни на по-малка възраст и удължаване на периода третиране на мъжките преди чифтосване. Вземането на клетки от влагалището/цервикса следва да бъде внимателно, за да се избегне увреждане на лигавицата и последващо индуциране на псевдобременност (10)(11).
41. След началото на отвореното състояние на вагината вагиналните натривки трябва да се изследват ежедневно при всички женски животни от F₁ в кохорта 1А, до записване на първото вроевяване, с цел да се определи времевият интервал между тези две събития. Естралните цикли при всички женски животни от F₁ в кохорта 1А следва също да бъдат наблюдавани през период от две седмици, започващ около ПНД 75. Освен това, в случай че чифтосването между животни от поколение F₁ е необходимо, вагиналната цитология при кохорта 1Б се следи от момента на чифтосването до откриването на доказателства за копулация.

Чифтосване и бременност

42. В допълнение към стандартните крайни точки (напр. телесно тегло, консумация на храна, клинични наблюдения, включително проверки за смъртност/заболеваемост) се записват датите на чифтосване, датата на осеменяване и датата на раждане и се изчисляват интервалът преди копулацията (от чифтосването до осеменяването) и продължителността на бременността (от осеменяването до раждането). Женските животни от Р трябва да бъдат внимателно прегледани по времето на очакваното раждане за наличие на признаци на трудно раждане. Всякакви отклонения в поведението при гнезденето или кърменето следва да се записват.

▼ M5

43. Датата на настъпване на раждането за майката е ден 0 от кърменето (ДК 0), а за потомството — постнатален ден 0 (ПНД 0). Като алтернатива, всички сравнения могат също да се основават на времето след чифтосването, за отстраняване на невъзможността за разграничаване на данните за постнаталното развитие поради разликите в продължителността на бременността; въпреки това, времето на раждането също трябва да бъде записано. Това е особено важно, когато изпитваният химикал оказва влияние върху продължителността на бременността.

Показатели за потомството

44. Всяко котило трябва да бъде прегледано възможно най-скоро след раждането (ПНД 0 или 1), за да се установи броят и полът на новородените, броят на мъртвородените и на живите, както и наличието на макроскопски аномалии (видими външно аномалии, включително вродена цепка на небцето; подкожни кръвоизливи; отклоняващ се от нормата цвят или строеж на тъканта на кожата; наличие на пъпна връв; липса на мляко в стомаха; наличие на изсушени секрети). Освен това, първият клиничен преглед на новородените следва да включва качествена оценка на телесната температура, състоянието на активността и реакцията на манипулиране. Намерените мъртви новородени в ПНД 0 или по-късно следва да бъдат прегледани за възможни дефекти и причина за смъртта. Живите новородени се изброяват и индивидуално се измерва теглото им в ПНД 0 или ПНД 1, и на редовни интервали след това, например в ПНД 4, 7, 14, и 21. Клиничните прегледи, както е приложимо в зависимост от възрастта на животните, трябва да се повтарят при претеглянето на потомството или по-често, ако са направени конкретни за дадения случай констатации при раждането. Отбелязваните симптоми могат да включват външни аномалии, изменения в кожата, козината, очите, лигавиците, появяване на секрети и екскрети и автономна активност, но без да се ограничават само до това. Следва да се записват също и изменения в походката, стойката и отговора при манипулиране, както и наличието на клонични или тонични движения, стереотипно или необичайно поведение.
45. Разстоянието между ануса и половите органи (РАПО) на всяко новородено животно трябва да бъде измерено най-малко веднъж от ПНД 0 до ПНД 4. Телесното тегло на новороденото следва да бъде измерено в деня на измерване на РАПО, и стойността на РАПО следва да бъде нормализирана към размера на новороденото, за предпочитане към кубичния корен от телесното тегло (12). Наличието на мамили/ареоли у мъжките новородени трябва да бъде проверено през ПНД 12 или 13.
46. Всички избрани животни от F₁ се оценяват ежедневно за отделяне на препуциума или отворено състояние на влагалището съответно за мъжките/женските, като се започне преди очаквания ден за постигането на тези крайни точки, за да се открие ако половото съзряване настъпва рано. Всякакви аномалии в половите органи, като персистиращо влакнесто образуване във влагалището (persistent vaginal thread), хипоспадия (или цепка на пениса), следва да се отбелязват. Полова зрялост на животните от F₁ се сравнява с физическото развитие чрез определяне на възрастта и телесното тегло при отделянето на препуциума или отвореното състояние на влагалището съответно за мъжките/женските (13).

Оценка на потенциалната невротоксичност за развиващия се организъм (кохорти 2А и 2Б)

47. За оценките на невротоксичността следва да се използват десет мъжки и 10 женски животни от кохорта 2А и 10 мъжки и 10 женски животни от кохорта 2Б от всяка третирана група (за всяка кохорта: 1 мъжо или 1 женско от котило; всички котила се представляват от най-малко по 1 новородено; избрани на случаен принцип). Животните от кохорта 2А трябва да бъдат подложени на изпитване чрез интензивни слухови стимули, батерия от функционални изпитвания, двигателна активност (вж. параграфи 48—50) и оценки на невропатологията (вж. параграфи 74—75). Следва да се положат усилия, за да се гарантира, че колебанията във всички условия на изпитването са минимални и не са систематически свързани с третирането. Между

▼ M5

променливите, които могат да повлияят върху поведението, са равнището на шума (напр. периодичен шум), температура, влажност, осветление, миризми, време от деня и свързани с околната среда причини за разсейване. Резултатите от изследванията за невротоксичност трябва да се тълкуват във връзка с подходящи контролни референтни обхвати от минали периоди. Животните от кохорта 2Б следва да се използват за оценка на невропатологията през ПНД 21 или ПНД 22 (вж. параграфи 74—75).

48. Изпитването чрез интензивни слухови стимули трябва да се извърши през ПНД 24 (± 1 ден), с използването на животни от кохорта 2А. Денят на изпитването следва да бъде балансиран между третираните и контролните групи. Всяка сесия се състои от 50 опита. При извършването на изпитването чрез интензивни слухови стимули следва да се определи средната амплитуда на отговора за всеки блок от 10 опита (5 блока от 10 опита), при оптимизирани с оглед привикване по време на сесиите условия на изпитването. Тези процедури трябва да съответстват на метод за изпитване В.53 (35).
49. В подходящ момент между ПНД 63 и ПНД 75, животните от кохорта 2А се подлагат на батерия от функционални изпитвания и автоматизирано изпитване на двигателната активност. Тези процедури трябва да съответстват на методи за изпитване Б.43 (33) и Б.53 (35). Батерията от функционални изпитвания включва пълно описание на външния вид, поведението и функционалната цялост на субекта. Това се оценява чрез наблюдения в клетката, която обитава животното, след изваждането му оттам — в стандартизирана арена за наблюдение (на открито), където животното се придвижва свободно, както и чрез изпитвания с манипулиране. Изпитванията трябва да се провеждат от най-малко интерактивното към най-интерактивното. Списък с мерки е представен в приложение 1. Всички животни следва да бъдат наблюдавани внимателно от обучени наблюдатели, които не са запознати с третирането на животните, с използване на стандартни процедури с оглед свеждане до минимум на варирането между различните наблюдатели. Когато е възможно, е препоръчително един и същ наблюдател да оценява животните в дадено изпитване. Ако това не е възможно, се изисква демонстриране на надеждността при резултатите между различните наблюдатели. За всеки параметър в батерията от поведенчески изпитвания следва да се използват категорично определени мащаби и критерии за използване на точкови системи. Ако е възможно, следва да бъдат разработени обективни количествени мерки за наблюдаваните крайни точки, включващи субективно класиране. Всяко животно се изпитва поотделно за двигателна активност. Провеждането на изпитвателната сесия следва да бъде с достатъчна продължителност, за да се докаже привикване по време на провеждането за контролите. Двигателната активност трябва да се наблюдава посредством автоматичен апарат за записване на активността, способен да улови и пониженията, и повишенията в активността (т.е. базовата активност, измервана от апарата, не следва да бъде с толкова ниска стойност, че да изключва възможността за откриване на пониженията, нито с толкова висока, че изключва откриване на повишенията на активността). Всяко устройство следва да бъде изпитвано чрез стандартни процедури, за да се гарантира, доколкото е възможно, надеждността на работата при различните уреди и в различните дни. Доколкото е възможно, третираните групи трябва да бъдат балансирани между устройствата. Групите за третиране следва да бъдат балансирани по време на изпитването по такъв начин, че да се избегне невъзможност за разграничаване от циркадните ритми на активност.
50. Ако съществуващата информация показва необходимостта от други функционални изпитвания (напр. сензорно, социално, когнитивно), те трябва да бъдат интегрирани, без да се излага на риск целостта на другите оценки, извършени при изследването. Ако това изпитване се извършва със същите животни, използвани за стандартното изпитване чрез интензивни слухови стимули, батерията от функционални изпитвания и изпитването на двигателната активност, различните изпитвания следва да се планират в графика по такъв начин, че да се сведе до минимум рискът от нарушаване на целостността на тези изпитвания. Допълнителни процедури могат да бъдат особено полезни, когато при емпиричните наблюдения, очакваните ефекти, или различни аспекти, свързани с механизма/начина на действие има показания за специфичен тип невротоксичност.

▼ M5

Оценка на потенциалната имунотоксичност за развиващия се организъм (кохорта 3)

51. През ПНД 56 (\pm 3 дни) 10 мъжки и 10 женски животни от кохорта 3 от всяка третирана група (1 мъжко или 1 женско от котило; всички котила се представляват от най-малко по 1 новородено; избрани на случаен принцип) следва да бъдат използвани в изследване за зависим от Т-клетки отговор чрез образуване на антитела, т.е. първичният отговор с IgM-антитела на зависим от Т-клетки антиген, като SRBC (червени кръвни клетки от овце) или KLH (хемоцианин от *Megathura crenulata*), в съответствие с актуалните процедури за изпитванията за имунотоксичност (14)(15). Отговорът може да бъде оценен чрез отчитане на специфични плакообразуващи клетки (PFC) в далака или чрез определяне на титъра на SRBC-специфични или KLH-специфични IgM-антитела в серум чрез ELISA, във върховата стойност на отговора. Върховата стойност на отговора се получава обикновено четири (отговор чрез PFC) или пет (ELISA) дни след интравенозната имунизация. Ако първичният отговор с антитела се изследва чрез преброяване на плакообразуващи клетки е допустимо да се оценяват подгрупи от животни в различни дни, при условие: че имунизациите и умъртвяването на подгрупите се определят във времето по такъв начин, че PFC да бъдат отчитани във върховата стойност на отговора; че подгрупите съдържат равен брой мъжко и женско потомство от всички групи на определена доза, включително контролните; и че подгрупите се оценяват на приблизително същата постнатална възраст. Експозицията на изпитвания химикал продължава до деня преди започване на събирането на далаците (за отговор чрез PFC) или серума (за изпитване с ELISA).

Последваща оценка на потенциалната токсичност за репродукцията (кохорта 1Б)

52. Третирането на животните от кохорта 1Б може да бъде поддържано след ПНД 90 и, ако е необходимо, същите могат да бъдат отглеждани за производство на поколение F₂. Мъжките и женските животни от същата група на определена доза трябва да бъдат поставени да съжителстват (като се избягва чифтосване между животни от едно и също котило) за максимален период от две седмици, започващ на ПНД 90 или след това, но не след ПНД 120. Процедурите следва да бъдат сходни на тези за животните от поколение Р. Въпреки това, въз основа на оценка на значимостта на доказателствения материал, може да е достатъчно за умъртвяване на котилата на ПНД 4, вместо изследването им до отбиването или след него.

НАБЛЮДЕНИЯ ПРИ ПРЕКРАТЯВАНЕТО**Клинична биохимия/хематология**

53. Системните ефекти трябва да бъдат наблюдавани при животните от поколение Р. При прекратяването се вземат кръвни проби на гладно от определено място от десет избрани по случаен начин мъжки и женски животни от Р на група на определена доза, съхраняват се при подходящи условия и се подлагат на частични или пълни хематологични и клинични биохимични изследвания на T4 и TSH, или други прегледи, предложени въз основа на известните ефекти от профила на изпитвания химикал (вж. Ръководство № 151 на ОИСП (40)). Следва да бъдат изследвани следните хематологични параметри: хематокрит, концентрация на хемоглобина, брой на еритроцитите, общ и диференциален брой левкоцити, брой на тромбоцитите, както и измерване на времето на съсирване/потенциала за съсирване на кръвта. Изследванията на плазма и серум следва да включват: глюкоза, общ холестерол, уреа, креатинин, общо белтъци, албумин и поне два ензима, показателни за хепатоцелуларни ефекти (като аланин, аминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, алкална фосфатаза, гама-глутамилтрансептидаза и сорбитолдехидрогеназа). Определянето на допълнителни ензими и жлъчни киселини може да даде полезна информация при определени обстоятелства. Освен това кръв от всички животни може да бъде вземана и съхранявана за евентуален анализ на по-късен етап, за да допринесе за изясняване на неясни ефекти или да генерира данни за вътрешна експозиция. Ако не се предвижда второ чифтосване на животните от поколение Р, кръвните проби се вземат непосредствено преди процедурата при планираното умъртвяване, или като част от нея. В случай на съхраняване на животните, кръвните проби се вземат няколко дни преди

▼ **M5**

животните да бъдат чифтосани повторно. Освен ако съществуващи данни от изследвания с повтаряща се доза показват, че параметърът не е засегнат от изпитвания химикал, анализът на урина следва да се извършва преди прекратяването, като се оценяват следните параметри: външен вид, обем, осмолалност или относителна плътност, рН, общо белтъци и глюкоза, кръв и кръвни клетки, клетъчни остатъци. Урина също може да бъде вземана за наблюдаване на екскрецията на изпитвания химикал и/или метаболит(и).

54. Системните ефекти трябва също да бъдат наблюдавани при животните от поколение F₁. При прекратяването се вземат кръвни проби на гладно от определено място от десет избрани по случаен начин мъжки и женски животни от кохорта 1A на група на определена доза, съхраняват се при подходящи условия и се подлагат на стандартни клинични биохимични изследвания, включително оценка на серумните нива на тироидни хормони (T4 и TSH), хематология (общ и диференциален брой левкоцити и брой на еритроцитите) и оценки на анализа на урина.
55. Излишъкът от новородени животни в ПНД 4, се подлагат на макроскопска аутопсия и се обръща внимание на измерването на концентрациите на серумен тироиден хормон (T4). Ако е необходимо, кръвта от новородените (ПНД 4) може да бъде обединена по котила за анализи на биохимия/тиреоиден хормон. Кръвта се събира също така и за анализ на T4 и TSH от животни след отбиването, подложени на макроскопска аутопсия през ПНД 22 (новородени от поколение F₁, които не са разпределени по кохорти).

Параметри за оценка на състоянието на сперматозоидите

56. Параметрите за оценка на състоянието на сперматозоидите се измерват във всички мъжки индивиди от поколение P, освен ако няма данни, които да показват, че параметрите за оценка на състоянието на сперматозоидите не са засегнати при 90-дневно изследване. Изследването на параметрите за оценка на състоянието на сперматозоидите трябва да бъде извършено на всички мъжки животни от кохорта 1A.
57. При прекратяването теглата на тестисите и епидидимите се записват за всички мъжки животни от P и F₁ (кохорта 1A). Най-малко един тестис и един епидидим се запазват за хистопатологично изследване. Останалият епидидим се използва за изброяване на резервите от сперматозоиди от опашката на епидидима (16)(17). В допълнение, сперматозоидите от опашката на епидидима (или семепровода) се събират чрез използването на методи, свеждащи до минимум уврежданията с оглед оценка на подвижността и морфологията на сперматозоидите (18).
58. Подвижността на сперматозоидите може да бъде оценена непосредствено след умъртвяването или записана за по-късен анализ. Процентът на прогресивно подвижните сперматозоиди може да се определи субективно или обективно чрез компютърен анализ на движението (19)(20)(21)(22)(23)(24). За оценка на морфологията на сперматозоидите, проба от сперматозоиди от епидидима (или семепровода) се изследват като фиксирани или влажни препарати (25) и най-малко 200 сперматозоиди от проба се класифицират или като нормални (както главата, така и средната част/опашката изглеждат нормални), или като отклоняващи се от нормата. Примери за морфологични отклонения са: слепване, наличие на глави, отделени от тялото и опашката, промени във формата на главите и/или опашките (26). Промени във формата на главите или големи глави на сперматозоиди може да показват дефекти в узряването на сперматозоидите.
59. Ако пробите от сперматозоиди са замразени, натривките са фиксирани и изображенията за анализ на движението на сперматозоидите са записани по време на аутопсията (27), последващият анализ може да бъде ограничен до мъжките от контролните групи и групите на висока доза. Въпреки това, ако се наблюдават ефекти, свързани с третирането, следва също да бъдат оценени и групите на по-ниска доза.

▼ M5

Макроскопска аутопсия

60. В момента на умъртвяването или при настъпването на преждевременна смърт по време на изпитването следва да се извърши аутопсия и макроскопски оглед на всички животни от Р и F₁, за да се установи наличието на структурни аномалии или патологични промени. Особено внимание при огледа трябва да се обърне на органите на половата система. Новородените, които са били в терминално състояние и са умъртвени по хуманен начин, или са умрели, трябва бъдат записани и, ако трупове им не са мацерирани, да се изследват за възможни дефекти и/или причини за смъртта и трупове им да бъдат запазени.
61. За полово зрели женски от Р и F₁ се изследва вагинална натривка в деня на аутопсия, за да се определи етапът на естралния цикъл и да се даде възможност за корелация с хистопатологичното изследване на репродуктивните органи. Матките на всички женски животни от Р (и женски от F₁, ако е приложимо) се изследват за наличие и брой на местата на имплантация, по начин, който не нарушава хистопатологичното изследване.

Тегло на органи и съхранение на тъкани — полово зрели животни от Р и F₁

62. Към момента на прекратяване телесните тегла и теглата в мокро състояние на органите, изброени по-долу, от всички животни от поколение Р и всички полово зрели животни от F₁ от всички относими кохорти (както е посочено по-долу), се определят колкото е възможно по-бързо след дисекцията, за да се избегне изсъхването им. Тези органи следва впоследствие да бъдат запазени при подходящи условия. Освен ако не е указано друго, всеки от чифтните органи може да се измери самостоятелно или в комбинация, в съответствие с обичайните практики на изпитващата лаборатория.
- Матка (с яйцепровод и шийка на матката), яйчници
 - Тестиси, епидидими (общо и опашката за проби, използвани за преброяване на сперматозоиди)
 - Простата (комбинирано дорзолатерален и вентрален дял). 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. В случай на свързан с третирането ефект върху общото тегло на простатата, на дорзолатералния и вентралния дял следва внимателно да се извърши дисекция след фиксиране, и да се претеглят поотделно.
 - Семенни мехурчета с коагулиращите жлези и течното им съдържимо (измерват се заедно)
 - Мозък, черен дроб, бъбреци, сърце, далак, тимус, хипофиза, щитовидна жлеза (след фиксиране), надбъбречни жлези и познати прицелни органи или тъкани.
63. В допълнение към органите, изброени по-горе, при подходящи условия следва да бъдат запазени проби от периферен нерв, мускул, гръбначен мозък, око плюс очен нерв, стомашно-чревен тракт, пикочен мехур, бял дроб, трахея (с прикрепени щитовидна жлеза и окощитовидна жлеза), костен мозък, семепровод (мъжки животни), млечна жлеза (мъжки и женски животни) и влагалище.
64. Всички органи на животните от кохорта 1А се претеглят и съхраняват за хистопатологично изследване.
65. За изследването на пренатално и постнатално индуцираните имуно-токсични ефекти 10 мъжки и 10 женски животни от кохорта 1А от всяка третирана група (1 мъжко или 1 женско от котило; всички котила се представляват от най-малко по 1 новородено; избрани на случаен принцип) се подлагат на следното при прекратяване:
- претегляне на лимфните възли, свързани с пътя на експозиция и отдалечени от него (в допълнение към теглото на надбъбречните жлези, тимуса и далака, вече измерено за всички животни от кохорта 1А)

▼ M5

— анализ на далачната субпопулация лимфоцити (CD4+ и CD8+ Т-лимфоцити, В-лимфоцити, както и клетки естествени убийци) с използване на едната половина от далака, като другата половина на далака се съхранява за хистопатологично изследване.

Анализът на далачните субпопулации лимфоцити в неимунизирани животни (коHORTА 1А) определя дали експозицията е свързана с изместване на разпределението при имунологичното стационарно състояние на „помощниците“ (CD 4 +) или цитотоксичните (CD 8 +) Т-лимфоцити или клетките естествени убийци (NK-клетки) (бързи отговори на неопластични клетки и патогени).

66. Следните органи на животните от коHORTА 1Б се претеглят и съответстващите тъкани се обработват във вид на блокчета:

- Влагалище (не претеглено)
- Матка, включително шийката
- Яйчници
- Тестиси (най-малко един)
- Епидидими
- Семенни мехурчета с коагулиращите жлези
- Простата
- Хипофиза
- Идентифицирани прицелни органи

При коHORTА 1Б следва да се извърши хистопатология, ако резултатите от коHORTА 1А са неясни, или в случаи на предполагаеми токсични за репродукцията химикали или нарушители на функциите на ендокринната система.

67. КоHORTИ 2А и 2Б: Изпитване за невротоксичност за развиващия се организъм (ПНД 21 или ПНД 22 и полово зряло потомство). Животните от коHORTА 2А се умъртвяват след поведенческите изпитвания, записва се теглото на мозъка им и им се извършва пълна неврохистопатология за целите на оценката на невротоксичността. Животните от коHORTА 2Б се умъртвяват през ПНД 21 или ПНД 22, записва се теглото на мозъка им и се извършва микроскопски оглед на мозъка за целите на оценката на невротоксичността. Фиксирането чрез перфузия е задължително за животните от коHORTА 2А и по избор за животните от коHORTА 2Б, съгласно метод за изпитване Б.53 (35).

Тегло на органи и съхранение на тъкани — отбити животни от F₁

68. Новородените, които не са разпределени по коHORTИ, включително малорасли животни, се умъртвяват след отбиването на ПНД 22, освен ако резултатите показват нужда от допълнителни интравитални проучвания. Умъртвените новородени животни се подлагат на макроскопска аутопсия, включително оценка на репродуктивните органи, както е описано в параграфи 62 и 63. Следва да се претеглят и съхраняват при подходящи условия мозък, далак и тимус от до 10 новородени животни от пол за група от толкова на брой котила, колкото е възможно. В допълнение, тъкани от млечните жлези на тези мъжки и женски новородени животни могат да бъдат съхранени за по-нататъшен микроскопски анализ⁽¹⁾ (вж. Ръководство № 151 на ОИСП (40)). Макроскопските аномалии и прицелните тъкани следва да бъдат запазени за възможно хистологично изследване.

⁽¹⁾ Изследванията показват, че млечната жлеза, особено при развитието на млечните жлези в ранния период, е чувствителна крайна точка за действието на естрогена. Препоръчва се крайните точки, включващи млечните жлези на новородени от двата пола, да бъдат включени в настоящия метод за изпитване при валидирането му.

▼ **M5****Хистопатология — животни от поколение P**

69. Пълно хистопатологично изследване на органите, посочени в параграфи 62 и 63, се извършва за всички животни от контролната група и групата на висока доза от поколение P. Органи, показващи свързани с третирането изменения, следва също да бъдат изследвани при всички животни в групите на по-ниска доза, за да се подпомогне определянето на NOAEL. Освен това на хистопатологично изследване трябва да бъдат подложени репродуктивните органи на всички животни, при които има съмнение за понижен фертилитет, например тези, при които чифтосването, оплождането или зачеването са били неуспешни, тези, които не са родили здраво потомство, както и тези, при които е засегнат естралният цикъл или се установяват промени в броя, подвижността или морфологията на сперматозоидите.

Хистопатология — животни от поколение F₁*Животни от кохорта 1*

70. Пълно хистопатологично изследване на органите, посочени в параграфи 62 и 63, се извършва за всички полово зрели животни от кохорта 1A от контролната група и групата на висока доза. Всички котила следва да се представляват от най-малко по 1 новородено от пол. Органи и тъкани, показващи свързани с третирането изменения, и всички макроскопски увреждания следва също да бъдат изследвани при всички животни в групите на по-ниска доза, за да се подпомогне определянето на NOAEL. За оценката на пренатално и постнатално индуцираните ефекти върху лимфоидните органи също така следва да се оцени и хистопатологията на събраните лимфни възли и костен мозък от 10 мъжки и 10 женски животни от кохорта 1A, освен хистопатологичната оценка на тимуса, далака, и надбъбречните жлези, която вече е извършена за всички животни от кохорта 1A.
71. Тъкани от репродуктивната и ендокринната система от всички животни от кохорта 1B, обработени във вид на блокчета, както е описано в параграф 66, трябва да се изследват за хистопатология в случаи на предполагаеми токсични за репродукцията химикали или нарушители на функциите на ендокринната система. На кохорта 1B също трябва да бъде направено хистологично изследване, ако резултатите от кохорта 1A са неясни.
72. Яйчниците на полово зрелите женски животни трябва да съдържат примордиални и зреещи фоликули, както и жълти тела; следователно хистопатологичното изследване следва да е насочено към количествена оценка на примордиални и малки зреещи фоликули, както и жълти тела, в женски животни от F₁; броят на животните, изборът на срезове от яйчниците и броят на срезове, включени в изследваната извадка, трябва да бъдат обосновани от статистическа гледна точка във връзка с използваната процедура за количествена оценка. Изброяването на фоликулите може първо да се извърши при животните от контролните групи и групите на висока доза и, в случай на неблагоприятен ефект при последните, следва да бъдат изследвани групите на по-ниски дози. Изследването следва да включва определяне на броя на примордиалните фоликули, които могат да се изброят заедно с малките зреещи фоликули, за сравнение с третираните и контролните яйчници (вж. Ръководство № 151 на ОИСП (40)). Оценката на жълтите тела следва да се извършва паралелно с изпитването на естралната цикличност, така че етапът на цикъла да може да бъде взет предвид при оценката. Яйцепроводът, матката и влагалището се изследват за подходящо типично за органа развитие.
73. Подробни изследвания на тестикуларната хистопатология се извършват на мъжките от поколение F₁, за да се определят свързани с третирането ефекти върху диференцирането и развитието на тестисите и върху сперматогенезата (38). Когато е възможно, трябва да бъдат изследвани срезове от мрежата на тестиса. Главата, тялото и опашката на епидидима и семепровода се изследват за подходящо типично за органа развитие, както и по отношение на параметрите, изисквани за мъжките от P.

▼ M5

Животни от кохорта 2

74. Неврохистопатологията се извършва за всички животни от кохорта 2А от групата на висока доза и контролната група по пол след завършване на невроповеденческите изпитвания (след ПНД 75, но не след ПНД 90). Хистопатологията на мозъка се извършва за всички животни от кохорта 2Б от групата на висока доза и контролната група по пол през ПНД 21 или ПНД 22. Органи или тъкани, показващи свързани с третирането изменения, следва също да бъдат изследвани при животните в групите на по-ниска доза, за да се подпомогне определянето на NOAEL. За животни от кохорти 2А и 2Б се изследват множество срезове от мозъка, за да се даде възможност за изследване на обонятелните луковици, кората на големия мозък, хипокампа, базалните ганглии, таламуса, хипоталамуса, средния мозък (тектум, тегментум и малкомозъчни крачета), мозъчен ствол и малък мозък. Само за кохорта 2А се изследват очите (ретината и очен нерв) и проби от периферен нерв, мускул и гръбначен мозък. Всички неврохистологични процедури трябва да съответстват на метод за изпитване В.53 (35).
75. Следва да се извършат морфометрични (количествени) оценки на представителни зони на мозъка (хомоложни срезове, внимателно подбрани въз основа на надеждни микроскопски ориентири) и същите могат да включват линейни измервания или измерване на площ на специфични области от мозъка. Следва да бъдат взети най-малко три последователни среза при всеки ориентир (равнище), с цел да се избере най-хомоложният и представителен срез за оценяването на специфична област от мозъка. Невропатологът следва да направи подходяща професионална преценка относно това дали приготвените за измерване срезове са хомоложни с други в набора от проби и оттам дали са подходящи за включване, тъй като в частност линейните измервания могат да се променят в рамките на относително кратко разстояние (28). Нехомоложни срезове не следва да се използват. Въпреки че целта е да се вземат проби от всички животни, предназначени за тази цел (10 от пол от ниво на доза), по-малък брой все още може да е подходящ. Пробите от по-малко от 6 животни от всеки пол и ниво на доза обаче по принцип не се считат за достатъчни за целите на настоящия метод за изпитване. Може да се използва стереология за установяване на свързани с третирането ефекти върху параметри като обем или брой на клетките за специфични невроанатомични области. Всички аспекти от подготовката на проби от тъкани, от фиксирането на тъкани през дисекцията на проби от тъкани, обработката на тъкани и оцветяването на предметните стъкла, трябва да са по план, балансиран така, че всяка партида да съдържа представителни извадки от всяка група с определена доза. Когато трябва да се използва морфометричен или стереологичен анализ, мозъчна тъкан следва да бъде включена в подходяща среда при всички нива на доза и по едно и също време, за да бъдат избегнати артефакти на свиване, свързани с продължително съхранение във фиксатор.

ДОКЛАДВАНЕ

Данни

76. Данните се докладват индивидуално и обобщени в табличен вид. Когато това е приложимо, за всяка изпитвана група и всяко поколение следва да бъдат докладвани: броят на животните в началото на изследването, броят на животните, които са открити мъртви по време на изследването или са били умъртвени по хуманни причини, времето на смъртта или умъртвяването по хуманни причини, броят на фертилните животни, броят на бременните женски животни, броят на женските животни, даващи котило и броят на животните с проявени признаци на токсичност. Следва също да бъде докладвано описание на токсичността, включително времето на настъпване, продължителността и силата.
77. Резултатите, изразени количествено, трябва да се оценят чрез подходящ и общоприет статистически метод. Статистическите методи следва да се подбират като част от плана на изследването и следва по подходящ начин да включват данни, които не са с нормално разпределение (например данни от броене), цензурирани данни (напр. ограничено време за наблюдение), измервания, които не са независими (например ефекти върху котилата и повтарящи се

▼ **M5**

мерки), както и нееднакви дисперсии. Обобщените смесени линейни модели и моделите доза-отговор обхващат широк клас от аналитични инструменти, които могат да бъдат подходящи за обработка на данните, получени съгласно настоящия метод за изпитване. Докладът трябва да включва достатъчно информация за използвания метод за анализ и компютърна програма, така че да може да бъде извършена оценка/повторна оценка от независим проверяващ/статистик.

Оценка на резултатите

78. Констатациите следва да се оценяват въз основа на наблюдаваните ефекти, включително данните от макроскопската аутопсия и микроскопските находки. Оценката включва връзката или липсата на връзка между дозата и наличието, честотата и силата на отклоненията от нормата, включително макроскопските увреждания. Следва да бъдат оценени и прицелните органи, плодовитостта, клиничните аномалии, параметрите на репродукцията и котилото, измененията в телесното тегло, смъртността и всякакви други ефекти, свързани с токсичността и развиващия се организъм. Специално внимание следва да се обърне на специфичните за пола изменения. Физичните и химичните свойства на изпитвания химикал и, когато са налични, данните от ТК, включително преминаване през плацентата и екскреция чрез млякото, трябва да се вземат под внимание при оценката на резултатите от изпитването.

Доклад от изпитването

79. Докладът от изпитването следва да включва следната информация, получена от животните от поколения P, F₁ и F₂ в рамките на настоящото изследване (където е уместно):

Изпитван химикал:

- Всяка налична информация за химичните, токсикокинетичните и токсикодинамичните свойства на изпитвания химикал;
- Данни за идентифициране;
- Чистота;

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, материали за гнездене и т.н.;
- Индивидуално тегло на животните в началото на изпитването;
- Данни за вагинални натривки за женски животни от P преди започване на третирането (ако са събрани данни към посочения момент);
- Записи за чифтосване за поколение P, указващи мъжкия и женския партньор от чифтосването и успешна копулация;
- Записи за котилото, от което произхожда животното за полово зрелите животни от поколение F₁;

Условия на изпитване:

- Обосновка за избора на нивото на доза;
- Подробна информация за състава на изпитвания химикал/изготвянето на хранителния режим, достигнати концентрации;

▼ M5

- Стабилност и хомогенност на сместа в носителя (напр. хранителен режим, питейна вода), в кръвта и/или в млякото при условията на използване и на съхранение между използванията;
- 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 тегло дневно), ако е приложимо;
- Подробна информация за качеството на храната и водата (включително състав на хранителния режим, ако е на разположение);
- Подробно описание на процедурата за избор на случаен принцип на новородени животни за бракуване, както и за разпределяне на новородени животни по групи за изпитване;
- Условия на околната среда;
- Списък на изследователския персонал, включително и професионално обучение;

Резултати (обобщение и индивидуални данни по пол и доза):

- Консумацията на храна, консумацията на вода, ако има данни, хранителна ефективност (наддаване на телесно тегло на грам консумирана храна, с изключение на периода на съжителството и по време на кърмене), както и консумация на изпитван химикал (за прилагане чрез хранителен режим/питейна вода) за животни от P и F₁;
- Данни за абсорбция, ако са налични;
- Данни за телесното тегло за животните от поколение P;
- Данни за телесното тегло на избраните животни от F₁;
- Време на настъпване на смъртта по време на изследването, или дали животните са преживели до прекратяването;
- Природа, сила и продължителност на клиничните наблюдения (независимо обратими или необратими);
- Данни от хематология, анализ на урина и клинична химия, включително TSH и T4;
- Фенотипен анализ на далачни клетки (T-, B-, NK-клетки);
- Клетъчност на костен мозък;
- Данни за токсичен отговор;
- Брой на женските животни от поколение P и F₁ с нормален или отклоняващ се от нормата естрален цикъл и продължителност на цикъла;
- Време до копулация (интервал преди копулацията, брой дни от чифтосването до копулацията);
- Токсични или други ефекти върху репродукцията, в това число брой и процентни дялове на животните, които са преминали през копулация, бременност, раждане и кърмене, на мъжките животни, предизвикали бременност, на женските животни с признаци на трудно/продължително раждане;
- Продължителност на бременността и, при наличност, раждане;
- Брой на имплантациите, големината на котилото и процент на мъжки новородени;
- Брой и процент на постимплантационната загуба, живородени и мъртвородени;

▼ M5

- Данни за тегло на котилото и на новородените (мъжки, женски и комбинирано), брой на малораслите животни, ако е определен;
- Брой новородени с видими макроскопски аномалии;
- Токсични или други ефекти върху поколението, постнатален растеж, жизнеспособност и т.н.;
- Данни за физическите ориентери на потомството и други данни за постнаталното развитие на организма;
- Данни за полово съзряване на животните от F₁;
- Данни за функционалните наблюдения при новородените и при полово зрелите животни, когато това е приложимо;
- Телесно тегло в деня на умъртвяването и данни за абсолютно и за относително тегло на органи за полово зрелите животни от P и F₁;
- Находки при аутопсията;
- Подробно описание на всички хистопатологични находки;
- Общ брой на сперматозоидите в опашката на епидидима, процент на прогресивно подвижните сперматозоиди, процент на сперматозоидите с нормална морфология и процент на сперматозоидите с всеки вид аномалия, който е установен за мъжки животни от P и F₁;
- Брой и етапи на узряване на фоликули, съдържащи се в яйчниците на женски животни от P и F₁, когато е приложимо;
- Изброяване на жълтите тела в яйчниците на женски животни от F₁;
- Статистическа обработка на резултатите, ако е подходящо;

Параметри на кохорта 2:

- Подробно описание на процедурите, които се използват за стандартизиране на наблюденията, и на процедурите, както и на работните определения при използване на точкови системи за наблюденията;
- Списък на всички използвани процедури на изпитване, както и обосновка за тяхното използване;
- Подробности за използваните поведенчески/функционални, невропатологични и морфометрични процедури, включително информация и подробности относно автоматизираните устройства;
- Процедури за калибриране и гарантиране на равностойността на устройствата и на балансирането на третираните групи в процедурите за изпитване;
- Кратка обосновка, която обяснява всички решения, свързани с професионална преценка;
- Подробности за всички поведенчески/функционални, невропатологични и морфометрични констатации по пол и група на определена доза, включващи както увеличението, така и намаляването в сравнение с контролите;
- Тегло на мозъка;
- Всякакви диагнози, получени от неврологични признаци и увреждания, включително появили се по естествен път заболявания или състояния;
- Изображения на репрезентативни находки;
- Изображения с незначително увеличение за установяване на хомоложността на срезове, използвани за морфометрията;

▼ **M5**

- Статистическа обработка на резултатите, включително статистически модели, използвани за анализ на данните и резултатите, независимо от това дали са значими, или не;
- Връзка на всякакви други токсични ефекти със заключението за невротоксичния потенциал на изпитвания химикал, по пол и група на определена доза;
- Въздействие на всякаква токсикокинетична информация върху заключенията;
- Данни в подкрепа на надеждността и чувствителността на метода за изпитване (*m.e.* положителни и контролни данни за минали периоди);
- Зависимости (ако има такива) между невропатологични и функционални ефекти;
- NOAEL или еталонна доза за майки и потомство, по пол и група на определена доза;
- Обсъждане на общото тълкуване на данните въз основа на резултатите, включително заключение дали химикалът е причинил невротоксичност за развиващия се организъм, и NOAEL.

Параметри на кохорта 3:

- Титри на IgM-антитела в серума (сенсбилизация към SRBC или KLH) или брой на IgM PFC в далака (сенсбилизация към SRBC);
- Прилагането на метода TDAR следва да бъде потвърдено като част от процеса на оптимизация от лаборатория, извършваща изследването за първи път, и периодично (например ежегодно) от всички лаборатории;
- Обсъждане на общото тълкуване на данните въз основа на резултатите, включително заключение дали химикалът е причинил имунотоксичност за развиващия се организъм, и NOAEL;

*Обсъждане на резултатите**Заключения, включително стойности на NOAEL, за ефектите върху родителите и потомството*

Цялата информация, която не е получена по време на изследването, но е полезна при тълкуването на резултатите (напр. сходства на ефектите на всички известни невротоксични химикали), следва също да бъде предоставена.

Тълкуване на резултатите

80. Чрез разширеното изследване за токсичност за репродукцията в едно поколение, според необходимостта, се осигурява информация за ефектите от повтарящата се експозиция на даден химикал през всички фази на репродуктивния цикъл. По-специално изследването дава информация за репродуктивната система, както и за развитието, растежа, преживяемостта и функционалните крайни точки на потомството до ПНД 90.
81. При тълкуването на резултатите от изследването следва да се вземе предвид цялата налична информация за химикала, включително физични, химични, токсикокинетични и токсикодинамични свойства, наличната относима информация за структурни аналози, и резултатите от предходни изследвания за токсичност с изпитвания химикал (напр. остра токсичност, токсичност след повтарящо се прилагане, механистични изследвания и изследвания за оценка на наличието на съществени качествени и количествени различия в метаболитните свойства *in vivo/in vitro* при различните видове). Резултатите от макроскопската аутопсия и телесното тегло трябва да се оценяват в контекста на наблюденията, проведени по време на други изследвания с повтаряща се доза, когато това е възможно. Намаленията в растежа на потомството биха могли да се разглеждат във връзка с влияние на изпитвания химикал върху състава на млякото (29).

▼ M5

Кохорта 2 (невротоксичност за развивающа се организъм)

82. Резултатите от невроповеденческите и невропатологическите изследвания следва да се тълкуват в контекста на всички находки, с използване на основан на тежестта на доказателствата подход с експертна преценка. Моделите на поведенчески или морфологични констатации, ако има такива, както и доказателства за зависимостта доза-отговор следва да бъдат обсъдени. В това охарактеризиране трябва да бъде включена оценката на невротоксичността за развиващ се организъм, включително епидемиологични изследвания върху човека или докладвани случаи и експериментални изследвания върху животни (напр. токсикокинетични данни, информация за зависимост структура-активност, данни от други изследвания за токсичност). Оценката на данните следва да включва обсъждане както на биологичната, така и на статистическата значимост. Оценката следва да включва връзката (ако има такава) между наблюдаваните невропатологични и поведенчески изменения. Насоки относно тълкуването на резултатите за невротоксичност за развиващ се организъм се съдържат в метод за изпитване Б.53 (35) и в Tyl et al., 2008 (31).

Кохорта 3 (имунотоксичност за развивающа се организъм)

83. Потискането или подобряването на имунната функция, както е оценено чрез TDAR (зависим от Т-клетки отговор чрез образуване на антитела), следва да се оценяват в контекста на всички извършени наблюдения. Значението на резултатите от TDAR може да бъде подкрепено от други ефекти върху имунологично-свързаните показатели (напр. клетъчност на костен мозък, тегло и хистопатология на лимфоидни тъкани, разпределение на подгрупите на лимфоцитите). Ефектите, установени чрез TDAR, могат да бъдат по-малко съдържателни при друга токсичност, наблюдавана при по-ниски концентрации на експозиция.
84. Ръководство № 43 на ОИСП следва да бъде консултирано за помощ при тълкуването на резултати за репродуктивната токсичност и невротоксичност (26).

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), 'A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment', *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69-98.
- (2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), 'Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530-536.
- (3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*, ILSI Press, Washington, DC.
- (4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), 'Direct Dosing of Prewaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', *International Journal of Toxicology*, 24, 87-94.
- (5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences*, 49, 1-4.
- (6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey', *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293-327.
- (7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356-369.

▼ M5

- (8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies', *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1-21.
- (9) Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', *Birth Defects Research, Part B*, 68, 408-415.
- (10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', *Birth Defects Research, Part B*, 80 (2), 84-97.
- (11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology*, 13: 383-390.
- (13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', *Biological Reproduction*, 17, 298-303.
- (14) Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', *Methods*, 41, 9-19.
- (15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Enmulat and D.J. Herzyk (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', *Toxicology*, 197, 23-35.
- (16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92-108.
- (17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 103-107.
- (18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat'. *Reproductive Toxicology*, 5, 39-44.
- (19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg, L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', *Reproductive Toxicology*, 10, 237- 244.
- (20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology*, 6, 267-273.
- (21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration', *Journal of Andrology*, 13, 409-421.
- (22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology*, 5, 449-458.

▼ M5

- (23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), 'Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer', *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.
- (24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), 'The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorohydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations', *Journal of Andrology*, 10, 401-415.
- (25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), 'Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants', *Reproductive Toxicology*, 6, 491-505.
- (26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, № 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.
- (27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), 'Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility', *Journal of Andrology*, 8, 330-337.
- (28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), 'A "Best Practices" Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today', *Toxicological Pathology*, 34, 296-313.
- (29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), 'Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components', *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8-16.
- (30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), 'Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats', *Environmental health perspectives*, 115(12), 1717-1726.
- (31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), 'Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints', *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349-381.
- (32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, № 422, OECD, Paris.
- (33) Глава Б.43 от настоящото приложение, Невротоксикологично изследване при гризачи
- (34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, № 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (35) Глава Б.53 от настоящото приложение, Изследване за невротоксичност за развиващия се организъм
- (36) Глава Б.54 от настоящото приложение, Утеротрофично биологично изследване при гризачи: Краткосрочно скринингово изследване за естрогенни свойства
- (37) Глава Б.55 от настоящото приложение, Биологично изследване на Hershberger при плъхове: Краткосрочно скринингово изследване за (анти)андрогенни свойства

▼ M5

- (38) OECD (2009), Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, № 106, OECD, Paris.
- (39) OECD (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, № 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.
- (40) OECD (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, № 151, OECD, Paris.

▼ M5*Допълнение 1***Измервания и наблюдения, включени в батерията от функционални изпитвания (Кохорта 2А)**

В клетка и на открито	Свързани с манипулиране	Физиологични
Стойка	Трудност на изваждане	Температура
Неволни клонични и тонични движения	Трудност на боравене	Телесно тегло
Затваряне на клепачите	Мускулен тонус	Реакция на зениците
Пилоерекция	Отговор при доближаване	Големина на зениците
Слюноотделяне	Отговор при допир	
Сълзотечение	Слухов отговор	
Издаване на звуци	Отговор при ощипване на опашката	
Изправяне на задни крайници	Рефлекс за връщане в първоначално положение след обръщане	
Аномалии в походката	Разстояние между лапите след пускане от 30 cm на земята	
Събуждане	Сила на захват на предните крайници	
Стереотипно поведение	Сила на захват на задните крайници	
Необичайно поведение		
Петна		
Аномалии в дишането		

▼ M5

Допълнение 2

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Химикал: Вещество или смес.

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

▼ M5

B.57. ИЗСЛЕДВАНЕ НА СТЕРОИДОГЕНЕЗАТА В H295R КЛЕТКИ

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 456 (2011). През 1998 г. ОИСП стартира с висок приоритет дейност по преразглеждане на съществуващите и по разработване на нови указания за скрининг и изпитвания за потенциално нарушаващи функциите на ендокринната система химикали (1). Концептуалната рамка на ОИСП от 2002 г. за изпитване и оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система, се състои от пет равнища, всяко от които съответства на различно равнище на биологична сложност (1). Изследването *in vitro* на стероидогенезата в H295R клетки (H295R), описано в настоящия метод за изпитване, при което се използва клетъчна линия от карцином на кората на надбъбреците при човека (NCI-H295R клетки), представлява равнище 2 „изследване *in vitro*, предоставящо механистични данни“, които да се използват за целите на скрининга и приоритизирането. Разработването и стандартизирането на изследването като скринингово за ефектите от химикали върху стероидогенезата, по-специално върху производството на 17 β -естрадиол (E2) и тестостерон (T), беше извършено като процес, включващ няколко стъпки. Изследването в H295R клетки е оптимизирано и валидирано (2)(3)(4)(5).
2. Целта на изследването на стероидогенезата в H295R клетки е да се открият химикали, които въздействат върху производството на E2 и T. Изследването в H295R клетки цели да се идентифицират ксенобиотици, имащи за свое прицелно място или места ендогенните компоненти, които включват вътреклетъчния биохимичен път, започващ с последователността от реакции от холестерола до производството на E2 и/или T. Изследването в H295R клетки не е предназначено за определяне на химикали, които засягат стероидогенезата поради въздействие върху хипоталамус-хипофиза-гонадата ос (ос ХХГ). Целта на изследването е да се предостави отговор „ДА/НЕ“ по отношение на потенциала на даден химикал да предизвиква или потиска производството на T и E2; В някои случаи обаче могат да бъдат получени количествени резултати (вж. параграфи 53 и 54). Резултатите от изследването се изразяват като относителни промени в производството на хормони в сравнение с контролните проби на разтворител (КПР). Изследването няма за цел да даде специфична механистична информация относно взаимодействието на изпитвания химикал с ендокринната система. Научните изследвания са проведени с използване на клетъчна линия, за да се идентифицират ефектите върху специфични ензими и хормони предшественици като прогестерон (2).
3. Определенията и съкращенията, използвани за този метод за изпитване, са описани в Допълнението. Подробен протокол, включително инструкции за начина, по който трябва да се приготвят разтвори и клетъчни култури, и да се извършват различни аспекти на изпитването, е на разположение като допълнение I-III към документ на ОИСП „Многолабораторно валидиране на изследването на стероидогенезата в H295R клетки за идентифициране на модулатори на производството на тестостерон и естрадиол“ (4).

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

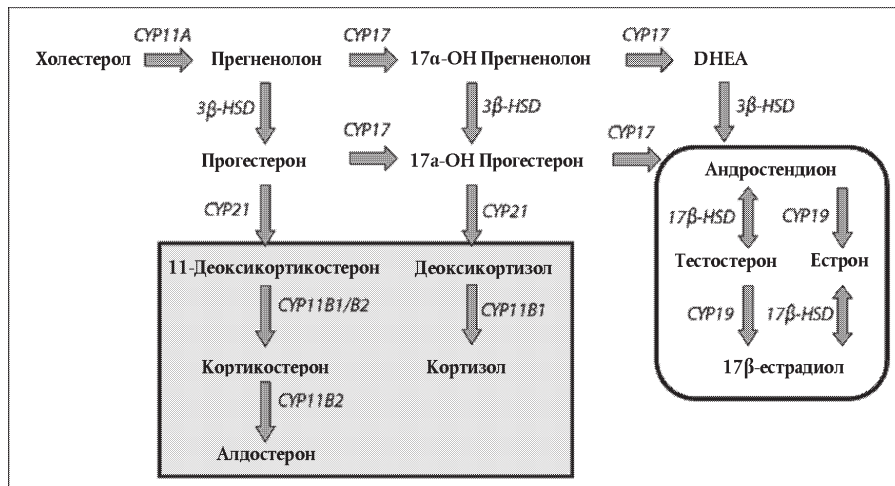
4. Пет различни ензима, катализиращи шест различни реакции, са свързани с биосинтезата на полови стероидни хормони. Превръщането по ензимен път на холестерола в прегненолон чрез ензим (CYP11A), прекъсващ страничната верига на холестерола, от цитохром P450 (CYP), представлява първата крачка в последователност от биохимични реакции, които завършват със синтеза на стероидни крайни продукти. В зависимост от порядъка на следващите две реакции, стероидогенният път се разделя на два пътя, Δ^5 -хидроксистероиден и Δ^4 -кетостероиден, които се сливат при производството на андростендион (фигура 1).
5. Андростендион се преобразува в тестостерон (T) от 17 β -хидроксистероиддехидрогеназа (17 β -HSD). Тестостеронът е едновременно предшественик и краен продукт. В мъжкия организъм T може да се преобразува в дихидротестостерон (ДХТ) чрез 5 α -редуктаза, която се намира в клетъчните мембрани, ядрената обвивка и ендоплазматичния ретикулум на прицелните за андрогенната активност тъкани, като простатата и семенните мехурчета. ДХТ е значително по-мошен андроген от T и също така се счита за краен продукт. Изследването на стероидогенезата в H295R клетки не измерва ДХТ (вж. параграф 10).

▼ M5

6. Ензимът в стероидогения път, който превръща андрогенни химикали в естрогенни химикали, е ароматаза (CYP19). CYP19 превръща Т в 17 β -естрадиол (E2) и андростендиона в естрон. E2 и Т се считат за крайни продукти на стероидогения път.
7. Спецификата на лиазната активност на CYP17 е различна при различните видове по отношение на междинните субстрати. При човека ензимът благоприятства субстрати на Δ^5 -хидроксистероидния път (прегненолон), докато при плъховете се благоприятстват субстрати от Δ^4 -кетостероидния път (прогестерон) (19). Тези разлики в лиазната активност на CYP17 могат да обяснят някои различия при отделните видове в отговора на химикали, които променят стероидогенезата *in vivo* (6). H295R клетките са показали, че съответстват в най-голяма степен на модела на генната експресия чрез ензими и производството на стероиди в надбъбречната жлеза на полово зрели хора (20), но е известно, че при тях експресията е чрез ензими както за Δ^4 -хидроксистероидния, така и за Δ^5 -кетостероидния път за синтеза на андрогени (7)(11)(13)(15).

Фигура 1

Стероидогенен път в H295R клетки.



Забележка:

Ензимите са в курсив, хормоните са с удебелен шрифт, а стрелките указват посоката на синтеза. Сивият фон показва кортикостероидни пътища/продукти. Пътищата/продуктите, свързани с половите стероидни хормони, са оградени в кръг. CYP = цитохром P450; HSD = хидроксистероиддехидрогеназа; DHEA = дехидроепиандростерон.

8. Моделът *in vitro* с клетъчна линия (H295R клетки) от карцином на кората на надбъбреците при човека е полезен за изследване на ефектите върху синтеза на стероидни хормони (2)(7)(8)(9)(10). Клетъчната линия H295R експресира гени, кодиращи всички посочени по-горе ключови ензими за стероидогенезата (11)(15) (Фигура 1). Това е уникално свойство, защото експресията *in vivo* на тези гени е зависима от тъканите и етапа на развитие на организма, като обичайно една отделно взета тъкан или етап на развитие на организма не експресира всички гени, участващи в стероидогенезата (2). H295R клетките притежават физиологични характеристики на зонално недиференцирани фетални клетки от надбъбречната жлеза при човека (11). Клетките представляват система *in vitro*, която е уникална с това, че те могат да произвеждат всички стероидни хормони, установени в кората на надбъбречната жлеза и гонадите при полово зрели хора, с което позволяват изпитване за ефектите както върху кортикостероидната синтеза, така и върху производството на полови стероидни хормони, като например андрогени и естрогени, въпреки че изследването е валидирано само за откриване на Т и Е2. Измененията, записани от системата за изпитване под формата на промяна в производството на Т и Е2, могат да бъдат в резултат от множество различни взаимодействия на изпитваните химикали със стероидогенни функции, които се експресират от H295R клетките. Те

▼ M5

включват модулация на експресията, синтезата или функцията на ензими, участващи в производството, преобразуването или елиминирването на стероидни хормони (12)(13)(14). Потискането на производството на хормони може да се дължи на пряко конкурентно свързване с ензим от метаболитния път, на въздействие върху кофактори като НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат) и цАМФ (цикличен аденозинмонофосфат), и/или на увеличение на стероидния метаболизъм или потискане на генната експресия по отношение на някои ензими в стероидогенния път. Докато потискането може да бъде функция както на преки, така и на косвени процеси, свързани с производството на хормони, индуцирането обикновено има непряк характер, като например чрез въздействие върху кофактори като НАДФ и цАМФ (както при форсколин), намаляване на стероидния метаболизъм (13), и/или положително регулиране на генната експресия при стероидогенезата.

9. Изследването на стероидогенезата в H295R клетки има няколко предимства:

- Дава възможност за откриване както на увеличения, така и на намаления в производството както на Т, така и на Е2;
- Позволява пряка оценка на потенциалното въздействие на химикалите върху клетъчната жизнеспособност/цитотоксичността. Това е важна характеристика, тъй като позволява различаване на ефектите, които се дължат на цитотоксичността, от дължащите се на прякото взаимодействие между химикали и стероидогенни пътища, което не е възможно в системи от тъканни експланти, които се състоят от множество видове клетки с различни степени на чувствителност и функционалност;
- То не изисква използването на животни;
- Клетъчна линия H295R се предлага в търговската мрежа.

10. Основните ограничения на изследването са, както следва:

- Неговият метаболитен капацитет е неизвестен, но вероятно доста ограничен; следователно химикали, които е необходимо да бъдат метаболитно активирани, вероятно ще бъдат пропуснати при това изследване.
- Тъй като произхожда от тъкан на надбъбречната жлеза, H295R притежава ензимите, способни да произвеждат глюкокортикоиди и минералкортикоиди, както и полови хормони; поради това ефектите върху производството на глюкокортикоиди и минералкортикоиди биха могли да окажат въздействие върху равнищата на Т и Е2, наблюдавани при изследването.
- То не измерва ДХТ и поради това от него не се очаква да открива химикали, които потискат 5 α -редуктаза, като в последния случай може да бъде използвано изследване на Hershberger (16).
- Изследването на стероидогенезата в H295R клетки не открива химикали, които пречат на стероидогенезата чрез оказване на въздействие върху хипоталамус-хипофиза-гонадна ос (ос ХХГ), тъй като това може да бъде изследвано само при невредими животни.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

11. Целта на това изследване е откриването на химикали, които въздействат върху производството на Т и Е2. Също така Т е предшественик в пътя, водещ до производството на Е2. Изследването може да открива химикали, които обикновено потискат или индуцират ензимите от стероидогенния път.

▼ M5

12. Изпитването обикновено се провежда при стандартни условия за клетъчни култури в 24-гнездови плаки. Като алтернатива, за изследването могат да бъдат използвани плаки с други размери; Въпреки това, посяването и условията на опита следва да бъдат съответно коригирани, за да се поддържа спазването на критериите за параметрите.
13. След период на аклиматизация от 24 часа в многогнездови плаки, клетките се експонират за 48 часа на седем концентрации от изпитвания химикал в най-малко три повторения. Независимо се провежда изпитване с разтворител и познат инхибитор и индуктор на производството на хормони при определена концентрация, като отрицателни и положителни контроли. В края на периода на експозиция средата се отстранява от всяко гнездо. Жизнеспособността на клетките във всяко гнездо се анализира незабавно след отстраняването на средата. Концентрациите на хормони в средата могат да бъдат измерени с помощта на различни методи, включително предлагани в търговската мрежа комплекти за измерване на хормони и/или инструментални техники, като например течна хроматография/маспектрометрия (LC-MS). Данните са изразени като кратно на изменението по отношение на контролата на разтворител и най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC). Ако резултатът от изпитването е отрицателен, най-високата изпитвана концентрация се докладва като концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC). Заключениеята относно способността на даден химикал да засегне стероидогенезата следва да се основават на най-малко две независими провеждания на изпитването. Първото независимо провеждане на изпитването може да функционира като независимо провеждане за определяне на обхвата с последващи корекции на концентрациите за независими провеждания 2 и 3, ако е приложимо, ако бъдат срещнати затруднения по отношение на разтворимостта или цитотоксичността, или ако изглежда, че активността на химикала е в края на изпитвания обхват от концентрации.

ПРОЦЕДУРА ОТНОСНО КУЛТУРИТЕ

Клетъчна линия

14. NCI-H295R клетките са достъпни в търговската мрежа от American Type Culture Collections (ATCC) след подписване на Споразумение за трансфер на материал (MTA) ⁽¹⁾.

Въведение

15. Поради промени в капацитета за производство на E2 с увеличаване на възрастта/броя пасажи (2) клетките следва да бъдат култивирани по специален протокол преди да бъдат използвани, и следва да бъдат отбелязани броят на пасажите от размразяването на клетките, както и номерът на пасажа, при който клетките са били замразени и поставени на съхранение в течен азот. Първото число указва текущия номер на пасажа, а второто число описва номера на пасажа, при който клетките са били замразени и поставени на съхранение. Например клетките, които са били замразени след петия пасаж и размразени, и след това са преминали през три разделяния (4 пасажа, като прясно размразените клетки се броят за пасаж номер 1), след като са били култивирани отново, следва да бъдат обозначени като пасаж 4.5. Пример за схема за номериране е показан в Допълнение I към доклада за валидирането (4).
16. Като основа за средата с добавки и средата за замразяване се използва изходна среда. Средата с добавки е необходим компонент при култивирането на клетки. Средата за замразяване е специално проектирана така, че да позволява замразяване на клетки за продължително съхранение без да се оказва въздействие върху тях. Преди употреба, Nu-Serum (или подобен серум с еднакви свойства, за който е доказано, че дава данни, които отговарят на изискванията за параметрите на изпитването и за контрол на качеството (КК)), който е съставка на средата с добавки, трябва да се анализира за фонови концентрации на Т и E2. Изготвянето на тези разтвори е описано в Допълнение II към доклада за валидирането (4).

⁽¹⁾ ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, [<http://www.lgcstandards-atcc.org/>].

▼ M5

17. След инициране на H295R клетъчна култура от оригинална партида от ATCC, клетките трябва да бъдат отглеждани в продължение на пет пасажа (*m.e.* клетките са разделяни 4 пъти). След това клетките от петия пасаж се замразяват в течен азот за съхранение. Преди замразяване на клетките, с проба от клетки от предходния четвърти пасаж независимо се провежда изпитване в плака за КК (виж параграфи 36 и 37), за да се провери дали основното производство на хормони и отговорът на химикали от положителната контрола съответства на критериите за контрол на качеството на изследването, определени в Таблица 5.
18. H295R клетките трябва да бъдат култивирани, замразени и съхранявани в течен азот, за да се гарантира, че винаги има на разположение клетки от подходящ пасаж/възраст за култивиране и използване. Максималният брой пасажи след започването на култивирането на партида нови ⁽¹⁾ или замразени ⁽²⁾ клетки, които са допустими за употреба в изследването на стероидогенезата в H295R клетки, не трябва да превишава 10. Например, допустими пасажи за култури от клетки от партида, замразена при пасаж 5, биха били пасажи от 4.5 до 10.5. За клетките, чието култивиране е започнало от тези замразени партиди, трябва да бъде следвана процедурата, описана в параграф 19. Тези клетки следва да бъдат култивирани в продължение на най-малко четири (4) допълнителни пасажа (пасаж 4.5) преди да бъдат използвани при изпитването.

Започване на култивирането на клетки от замразените количества

19. Процедурата за започване на култивирането на клетки от замразените количества следва да бъде използвана, когато нова партида на клетките се изважда от съхранение в течен азот с цел култивиране и изпитване. Подробности за тази процедура са дадени в Допълнение III от доклада за валидирането (4). Клетките се изваждат от съхранението в течен азот, бързо се размразяват и се поставят в среда с добавки в центрофужна епруветка, центрофугират се при стайна температура, ресуспендират се в среда с добавки и се прехвърлят в колба за клетъчни култури. Средата трябва да бъде сменена на следващия ден. H295R клетките се култивират в инкубатор при 37 °C с 5 % CO₂ във въздушна атмосфера и средата се подновява 2-3 пъти седмично. Когато настъпи приблизително 85—90 % сливане на клетките, те следва да бъдат разделени. Разделянето на клетките е необходимо, за да се осигури здравето и растежа на клетките и да се поддържат клетки за извършване на биологични изследвания. Клетките се промиват три пъти с фосфатно буферизиран физиологичен разтвор (PBS, без Ca²⁺ и Mg²⁺) и се отделят от колбата за клетъчни култури чрез добавяне на подходящ ензим за отделяне, напр. трипсин, в PBS (без Ca²⁺ и Mg²⁺). Непосредствено след като клетките бъдат отделени от колбата за клетъчни култури, действието на ензима следва да бъде прекратено с прибавяне на среда с добавки при съотношение от 3X от обема, използван за третиране с ензима. Клетките се поставят в центрофужна епруветка, центрофугират се при стайна температура, надутаечната течност се отстранява и клетъчната утайка се ресуспендира в среда с добавки. Подходящият обем клетъчен разтвор се поставя в новата колба за клетъчни култури. Обемът на клетъчния разтвор следва да се приспособи така, че клетките да достигнат сливане в рамките на 5—7 дни. Препоръчителното съотношение на субкултивиране е от 1:3 до 1:4. Плаката следва да бъде внимателно етикетирани. Клетките са вече готови за използване при изследването и излишните клетки следва да бъдат замразени в течен азот, както е описано в параграф 20.

⁽¹⁾ „Нова партида“ се отнася за нова партида от клетки, получени от ATCC.

⁽²⁾ „Замразена партида“ се отнася до клетки, които са били предварително култивирани и впоследствие замразени в лаборатория, различна от ATCC.

▼ **M5****Замразяване на H295R клетки (подготовка на клетки за съхраняване в течен азот)**

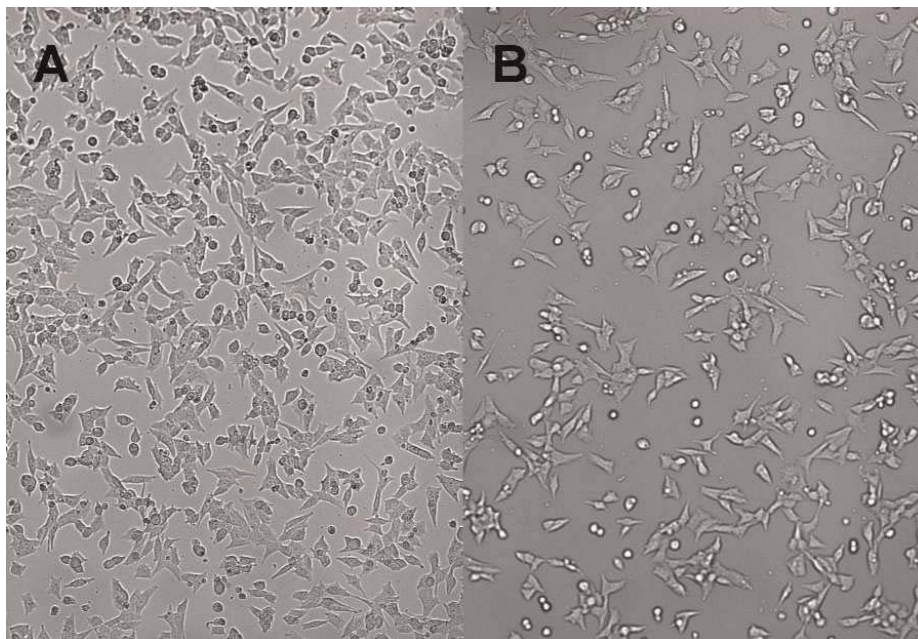
20. За подготовка на H295R клетките за замразяване трябва да бъде следвана описаната по-горе процедура за разделяне на клетките до стъпката по ресуспендиране на клетъчната утайка, образувана на дъното на центрофужната епруветка. На този етап клетъчната утайка се ресуспендира в среда за замразяване. Разтворът се прехвърля в подходящо етикетирани криоепруветки и се замразява при температура – 80 °C за 24 часа, след което криоепруветката се прехвърля в течен азот за съхранение. Подробности за тази процедура са дадени в допълнение III от доклада за валидирането (4).

Поставяне в плаки и предварителна инкубация на клетки за изпитването

21. Броят на 24-гнездовите плаки, приготвени както е посочено в параграф 19, които ще бъдат необходими, зависи от броя на химикалите, които ще бъдат изпитвани, и от сливането на клетките в блюдата с културите. Като общо правило, една колба за клетъчни култури (75 cm²) с 80—90 % достигнали сливане клетки осигурява достатъчно клетки за една до 1,5 (24-гнездова) плака при целева плътност от 200 000 до 300 000 клетки/ml от среда, водеща до сливане приблизително 50—60 % в гнездата след 24 часа (фигура 2). Това обичайно е оптималната плътност на клетките за производство на хормони при изследването. При по-висока плътност моделите на производство на Т, както и на Е2, се променят. Препоръчва се, преди провеждането на изследване за първи път, да бъдат изпитани различни посевни плътности — между 200 000 и 300 000 клетки/ml — и за последващи изпитвания да бъде избрана плътността, водеща до 50—60 % сливане след 24 часа в гнездото.

Фигура 2

Микрофотография на H295R клетки при плътност на посяване от 50 % в 24-гнездова плака за клетъчни култури след 24 часа, направена на ръба на гнездото (А) и в центъра му (Б)



22. Средата се отстранява от колбата за клетъчни култури с пипета и клетките се промиват 3 пъти със стерилен PBS (без Ca²⁺ и Mg²⁺). Добавя се ензимен разтвор (в PBS) за отделяне на клетките от колбата за клетъчни култури. След даване на достатъчно време за отделяне на клетките действието на ензима следва да бъде прекратено с прибавяне на среда с добавки при съотношение от 3× обема, използван за третиране с ензима. Клетките се поставят в центрофужна

▼ M5

епруветка, центрофугират се при стайна температура, надутаечната течност се отстранява и клетъчната утайка се ресуспендира в среда с добавки. Плътноста на клетките се изчислява, като се използва например хемоцитометър или клетъчен брояч. Разтворът с клетките следва да се разрежда до желаната плътност в гнездата и щателно да се разбърка, за да се осигури хомогенна плътност на клетките. Клетките следва да бъдат поставени в гнездата с 1 ml от разтвор с клетки във всяко гнездо, и плаките и гнездата следва да бъдат етикетирани. Плаките с поставените разтвори с клетки се инкубират при температура 37 °C при 5 % CO₂ във въздушна атмосферата в продължение на 24 часа, за да се даде възможност на клетките да се прикрепят към гнездата.

ИЗИСКВАНИЯ ЗА КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО

23. Изключително важно е по време на дозирането в гнездата да бъдат поставени точни обеми от разтвори и проби, тъй като тези обеми определят концентрациите, използвани в изчисленията на резултатите от изследването.
24. Преди инициране на клетъчната култура и всякакво последващо изпитване всяка лаборатория трябва да докаже чувствителността на своята система за измерване на хормони (параграфи 29—31).
25. Ако трябва да се извършват изследвания с измерване на хормони на основата на антитела, химикалите, които ще бъдат изпитвани, следва преди започване на изпитанието да се анализират за техния потенциал да пречат на системата за измерване, използвана за количествено определяне на Т и Е2, както е посочено в параграф 32.
26. Като разтворител за изследването се препоръчва диметилсулфоксид (DMSO). Ако се използва алтернативен разтворител, трябва да се определи следното:
 - Разтворимостта на изпитвания химикал, на форсколин и на прохлораз в разтворителя; както и
 - Цитотоксичността като функция от концентрацията на разтворителя.

Препоръчва се максимално допустимата концентрация на разтворителя да не превишава 10× разреждане на най-ниската концентрация на разтворителя, при която се появява цитотоксичност.
27. Преди провеждане на изпитването за първи път, лабораторията следва да проведе опит за определяне дали отговаря на условията, доказващ, че е в състояние да поддържа и постигне подходящи условия за клетъчните култури и условия на изпитването, изисквани за изпитване на химикала, както е описано в параграфи 33—35.
28. При започване на изпитване с използване на нова партида, преди да се използва новата партида от клетки, независимо се провежда изпитване в контролна плака, за да се направи оценка на параметрите на клетките, както е описано в параграфи 36 и 37.

Параметри на системата за измерване на хормони

Чувствителност на метода, точност, прецизност и кръстосана реактивност с матричната проба

29. За анализа на производството на Т и Е2 от H295R клетки всяка лаборатория може да използва система за измерване на хормони по свой избор, при условие че тази система отговаря на критериите за параметрите, включително границата на количествено определяне (LOQ). Номинално те са 100 pg/ml за Т и 10 pg/ml за Е2 и се основават на основните хормонални равнища, наблюдавани при изследванията за валидиране. Въпреки това могат да бъдат подходящи по-високи или по-ниски равнища, в зависимост от базисните хормонални равнища, достигнати в изпитващата лаборатория. Преди иницирането на плаката за КК и независимите провеждания на изпитването, лабораторията следва да докаже, че с изследването за хормони, което ще се

▼ M5

използва, концентрациите в средата с добавки могат да бъдат измерени с достатъчна точност и прецизност, за да отговорят на критериите за КК, посочени в таблици 1 и 5, като анализира белязана проба от среда с добавки с вътрешна контрола с хормон като внесена добавка. Пробата със средата с добавки следва да бъде белязана с прибавяне на най-малко три концентрации за всеки хормон (напр. 100, 500, и 2 500 pg/ml от Т; 10, 50 и 250 pg/ml от Е2; или възможно най-ниските концентрации, които се основават на границите на откриване на избраната система за измерване на хормони могат да се използват за най-ниските концентрации на внесена добавка за Т и Е2) и тази среда с добавки следва да бъде анализирана. Измерените концентрации на хормони в неизвлечени проби трябва да бъдат в рамките на 30 % от номиналните концентрации и колебанията при повторните измервания на една и съща проба не трябва да надвишават 25 % (вж. също таблица 8 за допълнителни критерии за КК). Ако тези критерии за КК са изпълнени, приема се, че избраното изследване за измерване на хормони е достатъчно точно и прецизно и при него не се наблюдава кръстосана реактивност с компонентите от средата (матрична проба), в резултат на която би могло да се очаква значително влияние върху резултата от изследването. В този случай не се изисква извличане на проби преди измерването на хормони.

30. В случай че критериите за КК в таблици 1 и 8 не са изпълнени, може да е налице значителен матричен ефект и следва да се извърши опит с извлечена белязана проба от среда. Пример за схема за извличане е описан в допълнение II към доклада за валидирането (4). Измерванията на концентрациите на хормони в извлечените проби трябва да бъдат направени трикратно. ⁽¹⁾ Ако може да се докаже, че след извличането компонентите на средата не пречат на метода за откриване на хормон, както е определено от критериите за КК, всички по-нататъшни опити следва да се извършват с използване на извлечени проби. Ако критериите за КК не могат да бъдат изпълнени след извличането, използваната система за измерване на хормони не е подходяща за целта на изследването на стероидогенезата в H295R клетки, и следва да бъде използван алтернативен метод за откриване на хормони.

Стандартна крива

31. Хормоналните концентрации в контролните проби на разтворител (SC) следва да бъдат в линейната част на стандартната крива. За предпочитане е стойностите на SC да са близо до центъра на линейната част, за да се гарантира, че индуцирането/потискането на синтеза на хормони може да бъде измерено. Разрежданията на средата (или екстрактите) за измерване трябва да бъдат съответно избрани. Линейната зависимост следва да се определя чрез подходящ статистически подход.

Изпитване за пречене на химикала

32. Ако трябва да се извършват изследвания с измерване на хормони на основата на антитела, като ензимно-свързани имуносорбентни анализи (ELISA) и радиоимунни изследвания (RIA), всеки химикал следва, преди започване на действителното изпитване на химикалите, да се анализира за потенциал да пречи на системата за измерване на хормони (Допълнение III от доклада за валидирането (4)), защото някои химикали могат да пречат на тези изпитвания (17). Ако се наблюдава пречене $\geq 20\%$ от основното производство на хормони за Т и/или Е2, както е определено от анализа на хормони, върху всички разреждания на изходния разтвор на изпитвания химикал независимо се провежда изпитването за влияние на химикали върху изследването за хормони (като описаното в раздел 5.0 от Допълнение III към доклада за валидирането (4)) за определяне на праговата доза, при която се наблюдава значително пречене ($\geq 20\%$). Ако влиянието е по-малко от 30 %, резултатите могат да бъдат коригирани с влиянието. Ако преченето превишава 30 %, данните са невалидни и данните при тези концентрации трябва да се игнорират. Ако значително пречене на

⁽¹⁾ *Забележка:* Ако се изисква извличане, за всяко извличане се извършват три повторения на измерванията. Всяка проба се извлича само веднъж.

▼ M5

даден изпитван химикал върху системата за измерване на хормони се наблюдава при повече от една концентрация, която не е цитотоксична, следва да се използва различна система за измерване на хормони. С цел да се избегнат пречения от замърсяване с химикали се препоръчва хормоните да се извличат от средата, като се използва подходящ разтворител — възможни методи могат да бъдат намерени в доклада за валидирането (4).

Таблица 1

Критерии за параметрите за системата за измерване на хормони

Параметър	Критерий
Чувствителност на метода за измерване	Граница на количествено определяне (LOQ) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ^(a)
Ефикасност на извличане на хормоните (само когато е необходимо извличане)	Средният процент на аналитичен добив (въз основа на трикратно повторение на измерването) за внесените добавки от хормони следва да не се отклонява с повече от 30 % от внесеното количество.
Пречене на химикала (само системи за измерване на основата на антитела)	Не следва да се наблюдава съществена кръстосана реактивност с някой от хормоните, произвеждани от клетките (\geq 30 % от основното производство на хормони за съответния хормон) ^(b) ^(c)

^(a) Бележка: Граничните стойности на измерване за дадения метод се основават на стойностите на основното производство на хормони, дадени в таблица 5, и са основани на параметрите. Ако може да се постигне по-голямо основно производство на хормони, границата може да бъде по-голяма.

^(b) При някои антитела на T и E2 може да се наблюдава по-голям процент на кръстосана реактивност, съответно с андростендион и естрон. В такива случаи е невъзможно да се определят точно ефектите върху 17 β -HSD. Въпреки това данните могат все пак да предоставят полезна информация относно ефектите върху производството на естрогени или андрогени като цяло. В такива случаи данните следва да бъдат изразени като андрогенни/естрогенни отговори, а не като E2 и T.

^(c) Те включват: холестерол, прегненолон, прогестерон, 11-деоксикортикостерон, кортикостерон, алдостерон, 17 α -pregnenolon, 17 α -progesteron, деоксикортизол, кортизол, дехидроепиандростерон (DHEA), андростендион, естрон.

Изпитване за пригодност на лабораторията

33. Преди изпитването на неизвестни химикали, лабораторията трябва да докаже, че е в състояние да постигне и поддържа подходящи условия за клетъчните култури и условия на изпитването, изисквани за успешното провеждане на изследването, чрез независимо провеждане на изпитването за пригодност на лабораторията. Тъй като извършването на дадено изследване е пряко свързано с персонала на лабораторията, извършващ изследването, тези процедури следва да бъдат частично повтаряни, ако настъпи промяна в персонала на лабораторията.
34. Това изпитване за пригодност се провежда при същите условия, изброени в параграфи 38—40, чрез експозиция на клетки на 7 нарастващи концентрации на силни, умерено силни и слаби индуктори и инхибитори, както и на отрицателен химикал (вж. таблица 2). По-конкретно, химикалите, които ще бъдат изпитвани, включват силния индуктор форсколин (CAS № 66575-29-9); силния инхибитор прохлораз (CAS № 67747-09-5); умерено силния индуктор атразин (CAS № 1912-24-9); умерено силния инхибитор аминоклутимид (CAS № 125-84-8); слабия индуктор (производство на E2) и слабия инхибитор (производство на T) бисфенол А (CAS № 80-05-7); и отрицателния химикал човешки хорионен гонадотропин (HCG) (CAS

▼ M5

№ 9002-61-3), както е показано в таблица 2. Независимо се провеждат изпитвания с отделни плаки за всички химикали, като за целта се използва формата, показан в таблица 6. Една плака за КК (таблица 4, параграфи 36—37) следва да бъде включена във всяко ежедневно независимо провеждане на изпитване с химикалите за изпитването за пригодност.

Таблица 2

Химикали за изпитването за пригодност и концентрации на експозиция

Химикал за изпитването за пригодност	Концентрации на изпитване [µM]
Прохлораз	0 ^(a) , 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Форсколин	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30
Атразин	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Аминоглутетимид	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Бисфенол А	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

^(a) Контрола на разтворител (DMSO) (0), 1 µl DMSO/гнездо

Експозицията на H295R на химикали за изпитването за пригодност следва да се извърши в 24-гнездови плаки по време на изпитването за пригодност на лабораторията. Дозирането е в µM, за всички дози на изпитвания химикал. Дозите следва да бъдат прилагани в DMSO при 0,1 % v/v на гнездо. Изпитването за всички изпитвани концентрации следва да бъде провеждано трикратно (таблица 6). Независимо се провеждат изпитвания с отделни плаки за всеки химикал. Една плака за КК се включва във всяко ежедневно независимо провеждане на изпитване.

35. Анализите на жизнеспособността на клетките и на хормоните следва да се извършват както е предвидено в параграфи 42 до 46. Праговата стойност (най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект, LOEC) и решението за класифициране следва да бъдат докладвани и сравнени със стойностите в таблица 3. Данните се считат за приемливи, ако отговарят на LOEC и решенията за класифициране в таблица 3.

Таблица 3

Прагови стойности (LOEC) и решения за класифициране за химикалите за изпитването за пригодност

	CAS №	LOEC [µM]		Решение за класифициране	
		T	E2	T	E2
Прохлораз	67747-09-5	≤ 0.1	≤ 1.0	+ ^(a) (Потискане)	+ (Потискане)
Форсколин	66575-29-9	≤ 10	≤ 0.1	+ (Индукция)	+ (Индукция)
Атразин	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Индукция)	+ (Индукция)
Аминоглутетимид	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (Потискане)	+ (Потискане)

▼ M5

	CAS №	LOEC [μm]		Решение за класифициране	
		T	E2	T	E2
Бисфенол А	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (Потискане)	+ (Индукция)
HCG	9002-61-3	не е приложимо	не е приложимо	Отрицателен	Отрицателен

(^a) +, положителен

не е приложимо: не е приложимо, тъй като не следва да настъпват изменения след експозиция на концентрации на отрицателен контрол, които не са цитотоксични.

Плака за контрол на качеството

36. Плаката за контрол на качеството (КК) се използва за проверка на параметрите на H295R клетките при стандартни условия за отглеждане на културата и за създаване на база данни от предходни изследвания за концентрации на хормони в контроли на разтворител, положителни и отрицателни контроли, както и други мерки за КК във времето.

— Параметрите на H295R клетките следва да се оценяват с използване на плака за КК за всяка нова партида от АТСС или след използването на предварително замразени количества клетки за първи път, освен ако независимото провеждане на изпитването за пригодност на лабораторията (параграфи 32—34) е било с тази партида клетки.

— Плаката за КК осигурява цялостна оценка на условията на изследването (напр. клетъчна жизнеспособност, контроли на разтворител, положителни и отрицателни контроли, както и вариране в рамките на дадено изследване и между различните изследвания) при изпитване на химикали и следва да бъде част от всяко независимо провеждане на изпитването.

37. Изпитването за КК се извършва в 24-гнездова плака и следва същите процедури за инкубация, дозиране, клетъчна жизнеспособност/цитотоксичност, извличане на хормони и анализ на хормони, описани в параграфи 38—46 за изпитването на химикали. Плаката за КК съдържа празни проби, контролни проби на разтворител и две концентрации на известен индуктор (форсколин, 10, 1 μM) и инхибитор (прохлораз, 0,1, 1 μM) на синтезата на E2 и T. В допълнение, в избрани гнезда се използва MeOH като положителна контрола за изследването за жизнеспособност/цитотоксичност. Подробно описание на структурата на плаката е представено в таблица 4. Критериите, на които трябва да отговаря плаката за КК, са изброени в таблица 5. Изискването за минимално основно производство на хормони за T и E2 следва да бъде изпълнено както за гнездата с контролните проби на разтворител, така и в тези с празните проби.

Таблица 4

Структура на плаката за контрол на качеството за изпитване на параметрите на неекспонирани H295R клетки и H295R клетки, експонирани на известни инхибитори (PRO = прохлораз) и стимулатори (FOR = форсколин) на производството на E2 и T. След прекратяването на опита с експозицията и отстраняването на средата се добавя 70 % разтвор на метанол към всички гнезда с MeOH, за да служи като положителна контрола за цитотоксичност (вж. изследването за цитотоксичност в допълнение III към доклада за валидирането (4))

	1	2	3	4	5	6
A	Празна проба (^a)	Празна проба (^a)	Празна проба (^a)	Празна проба (^a) (+ MeOH) (^b)	Празна проба (^a) (+ MeOH) (^b)	Празна проба (^a) (+ MeOH) (^b)
B	DMSO (^c) 1 μl	DMSO (^c) 1 μl	DMSO (^c) 1 μl	DMSO (^c) 1 μl (+ MeOH) (^b)	DMSO (^c) 1 μl (+ MeOH) (^b)	DMSO (^c) 1 μl (+ MeOH) (^b)

▼ M5

	1	2	3	4	5	6
C	FOR 1 µM	FOR 1 µM	FOR 1 µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM
D	FOR 10 µM	FOR 10 µM	FOR 10 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM

(^a) Клетките в гнездата с празни проби получават само среда (т.е. без разтворител).

(^b) Добавя се метанол (MeOH) след прекратяване на експозицията и отстраняване на средата от тези гнезда.

(^c) Контрола на разтворител DMSO (1 µl/гнездо).

Таблица 5

Критерии за параметрите за плаката за контрол на качеството

	T	E2
Основно производство на хормони в контролата на разтворител (SC)	≥ 5 пъти LOQ	≥ 2,5 пъти LOQ
Индукция (10 µM форсколин)	≥ 1,5 пъти SC	≥ 7,5 пъти SC
Потискане (1µM прохлораз)	≤ 0,5 пъти SC	≤ 0,5 пъти SC

ПРОЦЕДУРА ЗА ЕКСПОЗИЦИЯ НА ХИМИКАЛ

38. Предварително инкубираните клетки се изваждат от инкубатора (параграф 21) и се проверяват под микроскоп, за да се гарантира, че са в добро състояние (прикрепване, морфология) преди дозирането.
39. Клетките се поставят в камера за биологична безопасност, средата с добавки се отстранява и се заменя с нова среда с добавки (1 ml/гнездо). DMSO е предпочитаният разтворител за настоящия метод за изпитване. Въпреки това, ако съществуват причини за използване на други разтворители, следва да бъде дадена научна обосновка. Клетките се експонират на изпитвания химикал чрез прибавяне на 1 µl от подходящия изходен разтвор в DMSO (виж допълнение II към доклада за валидирането (4)) в 1 ml среда с добавки (обем на гнездото). Това води до крайна концентрация от 0,1 % DMSO в гнездата. За да се осигури подходящо смесване, като цяло е за предпочитане подходящият изходен разтвор на изпитвания химикал в DMSO да се смесва със средата с добавки за получаване на желаната крайна концентрация за всяка доза, и сместа да се добавя към всяко гнездо веднага след отстраняването на старата среда. Ако се използва този вариант, концентрацията на DMSO (0,1 %) следва да остане еднаква във всички гнезда. Гнездата, съдържащи двете най-високи концентрации, се проверяват визуално, чрез използване на стереоскопичен микроскоп, за образуване на утайки или за помътняване като показател за непълна разтворимост на изпитвания химикал. Ако се наблюдават такива обстоятелства (помътняване, образуване на утайки), съдържащите следващите по-ниски концентрации гнезда също се преглеждат (и т.н.) и концентрациите, които не са напълно разтворени, трябва да бъдат изключени от по-нататъшна оценка и анализ. Плаката се връща в инкубатор при 37 °C и 5 % CO₂ във въздушна атмосфера за 48 часа. Структурата на плаката с изпитвания химикал е показана в таблица 6. Изходни разтвори 1—7 показват поставяне на увеличаващи се дози от изпитвания химикал.

▼M5

Таблица 6

Схема на дозиране за експозиция на H295R клетки на изпитвани химикали в 24-гнездова плака

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Изходен разтвор 4	Изходен разтвор 4	Изходен разтвор 4
B	Изходен разтвор 1	Изходен разтвор 1	Изходен разтвор 1	Изходен разтвор 5	Изходен разтвор 5	Изходен разтвор 5
C	Изходен разтвор 2	Изходен разтвор 2	Изходен разтвор 2	Изходен разтвор 6	Изходен разтвор 6	Изходен разтвор 6
D	Изходен разтвор 3	Изходен разтвор 3	Изходен разтвор 3	Изходен разтвор 7	Изходен разтвор 7	Изходен разтвор 7

40. След 48 часа експонираните плаки се изваждат от инкубатора и всяко гнездо се проверява под микроскоп за състоянието на клетките (прикрепване, морфология, степен на сливане) и признаци на цитотоксичност. Средата от всяко гнездо се разделя на два равни обема (около 490 μ l всеки) и се прехвърля в два отделни флакона, етикетирани по подходящ начин (т.е. една аликвотна част за осигуряване на резервна проба за всяко гнездо). За предотвратяване на изсушаването на клетките средата се отстранява (по един ред или колона наведнъж) и се заменя със средата за изследването за клетъчна жизнеспособност/цитотоксичност. Ако клетъчната жизнеспособност/цитотоксичността не трябва да се измерва веднага, 200 μ l PBS с Ca^{2+} и Mg^{2+} се добавят към всяко гнездо. Средите се замразяват при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до понататъшното им обработване за анализ на концентрациите на хормони (вж. параграфи 44—46). T и E2 в среда, съхранявани при температура от $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, по принцип са стабилни за период от най-малко 3 месеца, но независимо от това стабилността на хормоните при съхранение следва да бъде документирана в рамките на всяка лаборатория.
41. Веднага след отстраняването на средата, клетъчната жизнеспособност/цитотоксичността се определят за всяка плака с определена експозиция.

Определяне на клетъчната жизнеспособност

42. Може да бъде извършено изследване по избор за клетъчна жизнеспособност/цитотоксичност за определяне на потенциалното въздействие на изпитвания химикал върху клетъчната жизнеспособност. Изследването следва да бъде в състояние да осигурява вярно измерване на процента на жизнеспособните клетки, намиращи се в гнездото, или трябва да се докаже, че то е пряко сравнимо с (линейна функция от) изпитване Live/Dead® (вж. приложение III от доклада за валидиране (4)). Алтернативно изследване, за което е доказано, че е равностойно, е изпитването с МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид] (18). Оценката на жизнеспособността на клетките по горепосочените методи е относително измерване, което не показва непременно линейни зависимости с абсолютния брой клетки в дадено гнездо. Поради това анализаторът следва да извърши субективна паралелна визуална оценка на всяко гнездо и следва да бъдат заснети и архивирани цифрови изображения на контролните проби на разтворителя и двете най-високи концентрации, които не са цитотоксични, за да може по-късно да се извърши оценка на истинската плътност на клетките, ако това се изисква. Ако от визуална инспекция или от показване с изследване за жизнеспособност/цитотоксичност изглежда, че има нарастване на броя на клетките, видимото нарастване трябва да бъде проверено. Ако при проверка се установи нарастване на броя на клетките, това трябва да бъде посочено в доклада от изпитването. Клетъчната жизнеспособност се изразява по отношение на средния отговор от контролните проби на разтворителя, за който се счита, че е за 100 % жизнеспособни клетки, и се изчислява по начин, подходящ за използваното изследване за жизнеспособност/цитотоксичност. За изпитването с МТТ може да се използва следната формула:

▼ M5

% **жизнеспособни клетки** = (отговор в гнездото – среден отговор в третиран с MeOH гнезда [= 100 % мъртви]) ÷ (среден отговор в гнезда със SC – среден отговор в третиран с MeOH гнезда [= 100 % мъртви])

43. Гнездата с жизнеспособност, по-ниска от 80 % в сравнение със средната жизнеспособност в SC (= 100 % жизнеспособност), не следва да се включват в окончателния анализ на данните. Потискането на стероидогенезата, протичащо в присъствието на почти 20 % цитотоксичност, следва да бъде внимателно оценявано, за да се гарантира, че цитотоксичността не е причината за потискането.

Анализ на хормони

44. За анализа на Т и Е2 всяка лаборатория може да използва система за измерване на хормони по свой избор. Резервните аликвотни части от среда от всяка група за третиране могат да бъдат използвани при изготвянето на разреждания за привеждане на концентрацията в рамките на линейната част от стандартната крива. Както е отбелязано в параграф 29, всяка лаборатория трябва да докаже съответствието на своята система за измерване на хормони (*напр.* ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) с критериите за КК като, преди да извърши независимо провеждане на изпитване за КК или преди изпитването на химикали, анализира белязана проба от среда с добавки с вътрешна контрола с хормон като внесена добавка. С цел да се гарантира, че компонентите на системата за изпитване не пречат на измерването на хормони, може да се наложи хормоните да бъдат извлечени от средите преди тяхното измерване (вж. параграф 30 за условията, при които се изисква или не се изисква извличане). Препоръчително е извличането да се извършва съгласно процедурите в допълнение III към доклада за валидирането (4).
45. Ако за измерване на производството на хормони се използва търговски комплект за изпитване, анализът на хормони трябва да се извършва съгласно наръчниците, предоставени от производителя на комплекта за изпитване. Повечето производители имат уникална процедура, по която се извършват анализите на хормони. Разрежданията на пробите трябва да бъдат коригирани по такъв начин, че очакваните концентрации на хормони за контролите на разтворител да попадат в центъра на линейния обхват на стандартната крива на отделното изследване (допълнение III към доклада за валидирането (4)). Стойностите извън линейната част на стандартната крива следва да бъдат отхвърлени.
46. Крайните концентрации на хормони се изчисляват по следния начин:

Пример:

Извлечени:	450 µl среда
Възстановени в:	250 µl буфер, използван при изследването
Разреждане при изследването:	1:10 (за да може пробата да попадне в рамките на линейния обхват на стандартната крива)
Концентрация на хормони при изследването:	150 pg/ml (вече коригирана до концентрация на ml изследвана проба)
Добив:	89 %
Крайна концентрация на хормони =	(Концентрация на хормони (на ml) ÷ добив) (коэффициент на разреждане)
Крайна концентрация на хормони =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼ M5

Избор на концентрации на изпитване

47. Изследването трябва да бъде извършено чрез най-малко две независими провеждания. Освен ако предварителна информация, като например информацията за границите на разтворимост или за цитотоксичността, предоставя основа за избора на концентрации на изпитване, препоръчва се концентрациите на изпитване при първоначалното независимо провеждане да бъдат разположени на интервали от \log_{10} с максимална концентрация 10^{-3} м. Ако химикалът е разтворим и не е цитотоксичен при никоя от изпитваните концентрации, и първоначалното независимо провеждане е дало отрицателен резултат при всички концентрации, тогава това трябва да бъде потвърдено с още едно независимо провеждане, като се използват същите условия, както при първоначалното независимо провеждане (таблица 7). Ако резултатите от първоначалното независимо провеждане са *неясни* (т.е. кратността на измененията е статистически значима по отношение на SC само при една концентрация) или положителни (т.е. кратността на измененията е статистически значима при две или повече съседни концентрации), изпитването следва да бъде повторено, както е посочено в таблица 7, чрез уточняване на избраните концентрации на изпитване. Концентрациите на изпитване при второто и третото независимо провеждания (ако е приложимо) следва да се коригират въз основа на резултатите от концентрациите от първоначалното независимо провеждане, при които има проявен ефект, като същите се обграждат с концентрации, разположени на интервал $1/2\text{-log}$ (например ако в резултат на първоначалното независимо провеждане при концентрации 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 μm има получена индукция при концентрации 1 и 10 μm , концентрациите на изпитване при второто независимо провеждане трябва да бъдат 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μm), освен ако трябва да бъдат използвани по-ниски концентрации за постигане на LOEC. В последния случай при второто независимо провеждане следва да се използват най-малко пет концентрации под най-ниската концентрация, изпитана при първоначалното независимо провеждане, с използване на скала с интервали от $1/2\text{-log}$. Ако при второто независимо провеждане не се потвърди първоначалното независимо провеждане (т.е. не се получи статистически значим резултат при концентрация, при която преди това е имало положителен резултат ± 1 интервал на концентрация), следва да бъде проведен трети опит, с използване на първоначалните условия на изпитване. Неясните резултати от първоначалното независимо провеждане се смятат за отрицателни, ако наблюдаваният ефект не е бил потвърден в никое от последващите независими провеждания. Неясните резултати се смятат за положителен отговор (ефект), когато отговорът може да се потвърди в най-малко още едно независимо провеждане в рамките на ± 1 интервал на концентрация (вж. раздел 55 за процедурата за тълкуване на данните).

Таблица 7

Матрица на решенията при възможни сценарии с резултати

Независимо провеждане 1	Независимо провеждане 2		Независимо провеждане 3		Решение	
	Решение	Сценарий	Решение	Сценарий	Положителен резултат	Отрицателен резултат
Отрицателен резултат	Потвърждаване (a)	Отрицателен резултат	Спиране			X
Отрицателен резултат	Потвърждаване (a)	Положителен резултат	Уточняване (b)	Отрицателен резултат		X
Неясен резултат (b)	Уточняване (b)	Отрицателен резултат	Потвърждаване (a)	Отрицателен резултат		X
Неясен резултат (c)	Уточняване (b)	Отрицателен резултат	Потвърждаване (a)	Положителен резултат	X	
Неясен резултат (c)	Уточняване (b)	Положителен резултат			X	
Положителен резултат	Уточняване (b)	Отрицателен резултат	Потвърждаване (a)	Положителен резултат	X	

▼ M5

Независимо провеждане 1	Независимо провеждане 2		Независимо провеждане 3		Решение		
	Сценарий	Решение	Сценарий	Решение	Сценарий	Положителен резултат	Отрицателен резултат
Отрицателен резултат	Потвърждаване (a)	Положителен резултат	Уточняване (b)	Положителен резултат		X	
Положителен резултат	Уточняване (b)	Положителен резултат	Спиране			X	

(a) Потвърждаване на предходното независимо провеждане, като се използва същият план за извършване на опита.

(b) Повтаряне на независимото провеждане при интервал на концентрациите $1/2\text{-log}$ (ображдащ концентрацията, която при изпитването е показала значими различия в предходния опит).

(c) Различията в кратността на измененията при една концентрация са статистически значими по отношение на SC.

Контрол на качеството при плаката за изпитване

48. В допълнение към критериите за плаката за КК съществуват и други критерии за качество, които трябва да бъдат спазени, и които се отнасят до приемливите колебания между гнездата за повторение, повтаряните опити, линейността и чувствителността на системите за измерване на хормони, варирането между измерванията на хормоните при повторенията в рамките на една и съща проба и процента на аналитичен добив за внесените добавки от хормони след извличането на средата (ако е приложимо; вж. параграф 30 относно изискванията за извличане) и тези критерии са дадени в Таблица 8. Данните трябва да попадат в допустимите обхвати, определени за всеки параметър, който трябва да се вземе предвид за последваща оценка. Ако тези критерии не са спазени, електронната таблица следва да отбележи, че критериите за КК не са били спазени за въпросната проба и пробата следва да се анализира отново, или да не бъде включена в набора от данни.

Таблица 8

Допустими обхвати и/или колебания (%) за параметрите в плаките за изпитване при изследване в H295R клетки

(LOQ: Граница на количествено определяне на системата за измерване на хормони. CV: Коефициент на вариация; SC: Контрола на разтворител; DPM: Разпадания за минута)

	Сравнение между	T	E2
Основно производство на хормони в SC	Кратност спрямо LOQ, по-голяма от	$\geq 5\text{-кратна}$	$\geq 2,5\text{-кратна}$
Опити с експозиция — CV в рамките на плаката за SC (гнезда за повторение)	Абсолютни концентрации	$\leq 30\%$	$\leq 30\%$
Опити с експозиция — CV между плаките за SC (повтаряни опити)	Кратност на измененията	$\leq 30\%$	$\leq 30\%$
Система за измерване на хормони — Чувствителност	Кратност на откриваемите изменения по отношение на SC	$\geq 5\text{-кратна}$	$\geq 2,5\text{-кратна}$
Система за измерване на хормони — CV на повтаряните измервания за SC (a)	Абсолютни концентрации	$\leq 25\%$	$\leq 25\%$
Извличане на средата — добив на вътрешен ^3H стандарт (ако е приложимо)	DPM:	$\geq 65\%$ от номиналното	

(a) Отнася се за повтаряни измервания на същата проба

▼ M5

АНАЛИЗ НА ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

Анализ на данни

49. За да се оцени относителното увеличение/намаление на измененото по химичен път производство на хормони, резултатите следва да бъдат стандартизирани спрямо средната стойност на SC за всяка плака за изпитване и изразени като изменения по отношение на SC във всяка плака за изпитване. Всички данни следва да бъдат изразени като средна стойност ± 1 стандартно отклонение (SD).
50. Само данните за хормони от гнезда, в които цитотоксичността е била под 20 %, следва да бъдат включени в анализа на данните. Относителните изменения следва да бъдат изчислявани по следния начин:

Относително изменение = (Концентрация на хормони във всяка плака) \div (Средна концентрация на хормони във всички гнезда с контрола на разтворител).

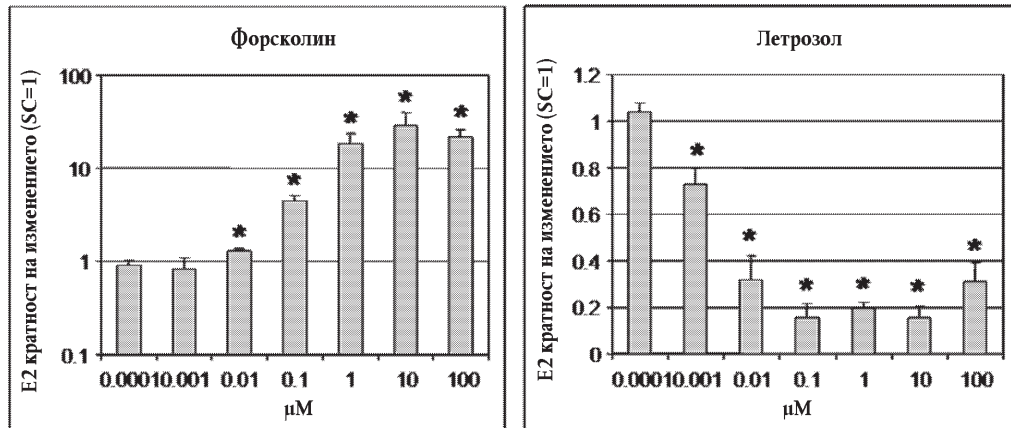
51. Ако от визуална инспекция на гнездото или от показване с изследване за жизнеспособност/цитотоксичност, описано в параграф 42, изглежда, че има нарастване на броя на клетките, видимото нарастване трябва да бъде проверено. Ако при проверка се установи нарастване на броя на клетките, това трябва да бъде посочено в доклада от изпитването.
52. Преди извършване на статистически анализи следва да бъдат оценени допусканията за нормалност и хомогенност на дисперсията. Нормалността следва да се оценява, като се използват графики за вероятности със стандартно разпределение или друг подходящ статистически метод (например изпитване на Shapiro-Wilk). Ако данните (кратност на измененията) не са с нормално разпределение, следва да се направи опит за трансформация на данните с цел доближаване до нормално разпределение. Ако данните са с нормално разпределение или се доближават до нормално разпределение, различията между групите с концентрация на химикал и контролите на носител следва да се анализират чрез изпитване на параметрично изпитване (напр. изпитване на Dunnett) като *концентрацията* е независимата променлива, а *отговорът* (кратност на измененията) е зависимата променлива. Ако данните не са с нормално разпределение, следва да бъде използвано подходящо непараметрично изпитване (като например изпитване на Kruskal Wallis или изпитване с рангови данни на Steel). Различията се считат за значими при $p \leq 0,05$. Статистически оценки се правят въз основа на средни стойности за всяко гнездо, които представляват независими точки с данни от повторения. Очаква се, че поради големия интервал между дозите при първоначалното независимо провеждане (скала \log_{10}) в много случаи няма да е възможно да се опишат ясни зависимости концентрация-отговор, при които двете най-големи дози да са в линейната част на сигмоидната крива. Следователно при първоначалното независимо провеждане или при всякакви други набори от данни, за които е изпълнено това условие (например в случаите, когато не може да бъде оценена максималната ефикасност), се използва статистика с фиксирана променлива от тип I, както е описано по-горе.
53. Когато повече от две точки с данни са разположени върху линейната част на кривата и когато максималните ефикасности могат да бъдат изчислени — както се очаква при някое от 2-рите независими провеждания, които са при интервали в полулогаритмичен мащаб на концентрациите на експозиция — следва за изчисляване на концентрации, при които се наблюдава ефект (напр. EC50 и EC20), да се използва Probit, Logit или друг подходящ регресионен модел.
54. Резултатите трябва да бъдат представени както в графичен (стълбовидна диаграма, представляваща средната стойност ± 1 SD), така и в табличен вид (LOEC/NOEC, посока на ефекта и сила на максималния отговор, който е частта доза-отговор от данните) (вж. фигура 3 за пример). Оценката на данните се счита за валидна само ако се основава на най-малко две независими провеждания. Опитът или независимото провеждане се считат за независими, ако са извършени на различна дата с използване на нов набор от разтвори и контроли. Използваният при независими провеждания 2 и 3 обхват от концентрации (ако е необходимо) може да се приспособи въз основа на резултатите от независимо провеждане 1, с цел по-добро определяне на обхвата доза-отговор, съдържащ LOEC (вж. параграф 47).

▼ M5

Фигура 3

Пример за представянето и оценката на данните, получени по време на извършването на изследването в H295R клетки, в графичен и в табличен вид.

Звездичките показват статистически значими разлики от контролата на разтворител ($p < 0,05$). LOEC: Най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект; Максимално изменение: Максимална сила на отговора, наблюдавана при която и да е концентрация спрямо средната стойност на отговора при SC (= 1)



Химикал	LOEC	Максимално изменение
Форсколин	0,01	0,15 пъти
Летрозол	0,001	29 пъти

Процедура за анализ на данните

55. Изследваният химикал се оценява като положителен, ако кратността на индукцията от стойността за контролата на разтворител е статистически значима ($p \leq 0,05$) при две съседни концентрации в най-малко две независими провеждания (таблица 7). Изпитваният химикал се счита за отрицателен след две независими провеждания с отрицателен резултат, или след три независими провеждания, включващи две независими провеждания с отрицателен и едно с неясен или положителен резултат. Ако данните, получени в резултат от три независими опита, не покриват критериите за решение, изброени в таблица 7, опитните резултати не могат да бъдат тълкувани. Резултатите при концентрации, превишаващи границата на разтворимост, или при цитотоксични концентрации не следва да бъдат включвани в тълкуването на резултатите.

Доклад от изпитването

56. Докладът от изпитването следва да включва следната информация:

Извършваща изпитвания лаборатория

- Наименование и местоположение на лабораторията;
- Ръководител на изследването и друг персонал, и отговорностите им във връзка с изследването;
- Дати, на които е започнало и приключило изследването;

▼ M5*Изпитван химикал, реагенти и контроли*

- Идентичност (наименование/CAS №, както е подходящо), източник, партида/номер на партидата, идентичност, чистота, доставчик и характеризирани на изпитвания химикал, реагентите и контролите;
- Физична природа и относими физични и химични свойства на изпитвания химикал;
- Условия на съхранение и метод и честота на изготвяне на изпитвани химикали, реагенти и контроли;
- Стабилност на изпитвания химикал;

Клетки

- Източник и тип на клетките;
- Брой клетъчни пасажи (идентификатор на клетъчни пасажи) за клетките, използвани в изпитването;
- Описание на процедурите за поддържане на клетъчните култури;

Изисквания преди изпитването, ако е приложимо

- Описание и резултати от изпитването за пречене на изследването за хормони от страна на химикала;
- Описание и резултати от измерванията на ефикасността на извлечането на хормони;
- Стандартни и калибрационни криви за всички аналитични изследвания, които трябва да бъдат извършени;
- Граници на откриване за избраните аналитични изследвания;

Условия на изпитването

- Състав на средата;
- Концентрация на изпитвания химикал;
- Клетъчна плътност (очаквана или измерена концентрации на клетки след 24 часа и 48 часа)
- Разтворимост на изпитвания химикал (граница на разтворимост, ако е определена);
- Време и условия на инкубация;

Резултати от изпитванията

- Необработени данни за всяко гнездо с контрола и изпитвани химикали — всяко измерване от повторение е във формата на оригиналните данни, предоставяни от инструмента, използван за измерване на производството на хормони (например оптична плътност, флуоресцентни единици, DPM и т.н.);
- Валидиране на нормалността или обяснение на трансформирането на данните;
- Средни отговори ± 1 SD за всяко измерено гнездо;
- Данни за цитотоксичността (изпитвани концентрации, които са причинили цитотоксичността);
- Потвърждение, че са спазени изискванията за КК;

▼ **M5**

- Относителна промяна в сравнение с контрола на разтворител, коригирана за цитотоксичност;
- Стълбовидна диаграма, показваща относителното изменение (кратността) при всяка концентрация, SD и статистическата значимост, както е посочено в параграфи 49—54.

Тълкуване на данните

- Към резултатите се прилага процедурата за тълкуване на данните и се обсъждат констатациите;

Обсъждане

- Има ли в резултат от изследването множество показания за възможността данните за T/E2 да бъдат повлияни от непреки ефекти върху глюкокортикоидните и минералкортикоидните пътища?

*Заклучения***ЛИТЕРАТУРА**

- (1) OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, в допълнение 2 към глава Б.54 от настоящото приложение
- (2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 217, 114-124.
- (3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res.*, 14, 23 — 30.
- (4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment № 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Available at [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
- (5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis*, OECD Series of Testing and Assessment № 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
- (6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, Available at: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]
- (7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.*, 81, 78-89.
- (8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 182, 44-54.
- (9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.*, 118: 265-272.

▼ **M5**

- (10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.*, 17:1137-1148.
- (11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.*, 50, 5488-5496.
- (12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere*, 80:578-584.
- (13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.*, 39:2777-2785.
- (14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.*, 17:1137-1148.
- (15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 731-737.
- (16) Глава Б.55 от настоящото приложение: Биологично изследване на Hershberger при плъхове: Краткосрочно скринингово изследване за (анти)андрогенни свойства.
- (17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.*, 2, 222-231.
- (18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.*, 65, 55-63.
- (19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, *Biochemistry*. 38:1598-1606.
- (20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, *J. Appl. Toxicol.*, 26:484-492.

▼ **M5***Допълнение***ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

Сливане означава позволеното за клетките покритие или разпространение върху средата за клетъчни култури или в нея.

Химикал означава вещество или смес.

CV означава коефициент на вариация и се определя като съотношение между стандартното отклонение на дадено разпределение и неговата средноаритметична стойност.

CYP означава цитохром P450 монооксигенази, семейство от гени и произведения от тях ензими, които участват в катализирането на голямо разнообразие от биохимични реакции, включително синтеза и метаболизма на стероидни хормони.

DPM означава разпадания в минута. Това е откритият в продължение на една минута брой атоми в определено количество радиоактивен материал, при които е настъпило разпадане.

E2 е 17 β -естрадиол, най-важният естроген при бозайниците.

H295R клетките са клетки от карцином на кората на надбъбреците при човека, които притежават физиологични характеристики на зонално недиференцирани фетални клетки от надбъбречната жлеза при човека, и които експресират всички ензими от стероидогенния път. Те са на разположение от ATCC.

Среда за замразяване се използва за замразяване и съхраняване на замразени клетки. Състои се от изходна среда плюс BD NuSerum и диметилсулфоксид.

Линесен обхват е обхватът в рамките на стандартната крива за дадена система за измерване на хормони, в който резултатите са пропорционални на концентрацията на присъстващия в пробата определяем компонент.

LOQ означава „*граница за количествено определяне*“ и представлява най-малкото количество на химикал, което може да бъде разграничено от липсата на този химикал (стойност на празната проба) в рамките на посочена граница на доверителен интервал. За целите на настоящия метод LOQ обикновено се определя от производителя на системите за изпитване, ако не е указана по друг начин.

ЛОЕС е най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект, най-ниското равнище на концентрация, при което от статистическа гледна точка отговорът при изследването е различен от този при контролата на разтворител.

НОЕС е концентрация без наблюдавано въздействие, която е най-високата изпитвана концентрация, ако при изследването не е получен положителен отговор.

Пасаж е броят пъти на разделяне на клетките след иницирането на култура от клетки от замразени количества. На първоначалния пасаж, инициран от замразените количества, се дава номер едно (1). Клетките, които са били разделени 1 път се наричат пасаж 2 и т.н.

PBS е фосфатно буфериран физиологичен разтвор на Dulbecco.

Контрол на качеството, съкратено КК, се отнася до мерките, необходими за осигуряване на валидни данни.

Плака за контрол на качеството е 24-гнездова плака, съдържаща две концентрации на положителни и отрицателни контроли за наблюдение на параметрите на нова партида от клетки или за предоставяне на положителните контроли за изследването, когато се изпитват химикали.

Независимо провеждане е независим опит, характеризирани с нов набор от разтвори и контроли.

▼ M5

Изходна среда е основата за приготвянето на други реагенти. Състои се от DMEM/F12 (смес в съотношение 1: 1 от Dulbecco's Modified Eagle's Medium и Ham's F-12 Nutrient) в 15 mM буфер HEPES без фенолно червено или натриев бикарбонат. Натриев бикарбонат се добавя като буфер, вж. допълнение II към доклада за валидирането (4).

Среда с добавки се състои от изходна среда плюс BD Nu-Serum и ITS+ premium mix, вж. допълнение II към доклада за валидирането (4).

Стероидогенеза е път, водещ до синтез на различните стероидни хормони от холестерол. Няколко предшественици от пътя за синтез на стероиди, като прогестерон и тестостерон, сами по себе си са важни хормони, но също така служат и като прекурсори за хормони, произвеждани по-нататък по пътя за синтез.

T означава тестостерон, един от двата най-важни андрогена при бозайниците.

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

Плака за изпитване е плака, на която H295R клетки се експонират на изпитвани химикали. Плаките за изпитване съдържат контролата на разтворител и изпитвания химикал в седем равнища на концентрация трикратно.

Трипсин 1X е разреден разтвор на ензима трипсин, панкреатична серин-протеаза, използван за отделяне на клетките от плака за клетъчни култури, вж. Допълнение III към доклада за валидиране (4).

▼ M5

Б.58. ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА ГЕННИ МУТАЦИИ В СОМАТИЧНИ И ЗАРОДИШНИ КЛЕТКИ ПРИ ТРАНСГЕННИ ГРИЗАЧИ

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 488 (2013). На разположение са методи на ЕС за изпитване за широк набор от изпитвания за мутации *in vitro*, чрез които могат да бъдат откривани хромозомни и/или генни мутации. Съществуват методи за изпитване за крайни точки *in vivo* (т.е., хромозомни аберации и непрограмиран синтез на ДНК); те обаче не измерват генни мутации. Изследванията за мутации при трансгенни гризачи (TGR) запълват нуждата от практични и широкодостъпни изпитвания *in vivo* за генни мутации.
2. Изследванията за мутации при TGR са разгледани подробно (24)(33). Те използват трансгенни плъхове и мишки, които съдържат множество копия на хромозомно интегрирани плазмидни или фагови вектори совалки. Трансгените съдържат репортерни гени за откриване на различни видове мутации, индуцирани *in vivo* от изпитвани химикали.
3. Мутациите, възникващи при гризачи, се отчитат чрез отделяне на трансгена и анализиране на фенотипа на репортерния ген в бактериален гостоприемник, в който репортерният ген липсва. Изследванията за генни мутации при TGR измерват мутациите, индуцирани в генетично неутрални гени, отделени от почти всички тъкани при гризачи. Тези изпитвания, следователно, заобикалят много от съществуващите ограничения, свързани с изследване на генна мутация *in vivo* в собствени гени (напр. ограничени тъкани, подходящи за анализ, положителен/отрицателен подбор по отношение на мутации).
4. Оценката на значимостта на доказателствения материал показва, че трансгените отговарят на мутагени по подобен начин на собствените гени, особено по отношение на откриването на заместване на двойка бази, мутации с изместване на рамката на разчитане и малки делеции и инсерции (24).
5. На Международните семинари относно изпитванията за генотоксичност (IWGT) е потвърдено включването на изследванията за генни мутации при TGR за откриване *in vivo* на генни мутации, и е препоръчан протокол за тяхното изпълнение (15)(29). Настоящият метод за изпитване се основава на тези препоръки. Допълнителен анализ в подкрепа на използването на настоящия протокол е на разположение в (16).
6. Очаква се, че в бъдеще може да съществува възможност за съчетаване на изследванията за генни мутации при TGR с изследвания за токсичност при повтарящи се дози (глава Б.7 от настоящото приложение). Въпреки това са необходими данни за гарантиране, че чувствителността на изследванията за генни мутации при TGR не се влияе от по-краткия едномесечен период между края на периода на прилагане и времето на пробовземане, както се прилага при изследвания за токсичност при повтарящи се дози, в сравнение с 3-дневния период, използван в изследванията за генни мутации при TGR. Също така са необходими данни, които да показват, че параметрите на изследванията при повтарящи се дози няма да бъдат неблагоприятно повлияни от използването на трансгенни породи гризачи вместо обичайни породи гризачи. Когато тези данни бъдат налични, настоящият метод за изпитване ще бъде актуализиран.
7. Определенията на ключови термини са дадени в допълнението.

▼ M5

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

8. Изследванията за генни мутации при TGR, за които има достатъчно налични данни за подкрепа на използването им в настоящия метод за изпитване, са: мишка, носеща бактериофаг, съдържащ *lacZ* (Muta™Mouse); мишка, носеща плазмид, съдържащ *lacZ*; мишка и плъх *gpt delta* (*gpt* и *Spi*⁻); мишка и плъх, носещи *lacI* (Big Blue®), извършвани при стандартни условия. В допълнение, изследването с положителна селекция на *cII* може да бъде използвано за оценка на мутациите в моделите Big Blue® и Muta™Mouse. Мутагенезата в моделите с TGR се оценява по принцип като честота на мутантите; ако е необходимо обаче, чрез молекулярен анализ на мутациите може да бъде предоставена допълнителна информация (вж. параграф 24).
9. Тези изпитвания за генна мутация *in vivo* при гризачи са особено важни за оценка на мутагенната опасност, поради това че отговорите при изследванията зависят от метаболизма *in vivo*, от фармакокинетиката, от процесите на репарация на ДНК и синтеза на ДНК чрез повредени участъци, въпреки че те могат да варират според вида, тъканта и вида увреждане на ДНК. Изследването *in vivo* за генни мутации е полезно за по-нататъшното проучване на мутагенен ефект, установен чрез система *in vitro*, както и за проследяване на резултатите от изпитвания, използващи други крайни точки *in vivo* (24). Освен че има причинно-следствена връзка с предизвикването на рак, генната мутация е относима крайна точка за прогнозиране на основани на мутация неракови заболявания на соматичните тъкани (12)(13), както и на болести, предавани чрез зародишната линия.
10. Ако има доказателства, че изпитваният химикал, или относим метаболит, не достига никоя от представляващите интерес тъкани, извършването на изследване за генни мутации при TGR не е подходящо.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

11. В изследванията, описани в параграф 8, прицелният ген по произход е от бактерия или бактериофаг, и средството за отделяне от геномната ДНК при гризачи е чрез включването на трансгена в λ бактериофаг или плазмид като вектор совалка. Процедурата включва извличането на геномна ДНК от представляваща интерес тъкан от гризач, обработка *in vitro* на геномната ДНК (т.е. опаковане на λ вектори, или лигиране и електропорация на плаزمиди за отделяне на вектора совалка) и последващо откриване на мутации в бактерии гостоприемници при подходящи условия. При изследванията се използват неутрални трансгени, които могат да бъдат лесно изолирани от повечето тъкани.
12. Основният опит, свързан с генна мутация при TGR, включва третиране на гризач с химикал за определен период от време. Химикалите могат да се прилагат посредством всякакви подходящи пътища, включително имплантация (напр. изпитване на медицинско изделие). Общата продължителност на дозиране на дадено животно се нарича период на прилагане. Прилагането обикновено е последвано от период от време, предхождащ умъртвяването, през които химикалът не се прилага, и по време на който нерепарираните повреди в ДНК се фиксират в стабилни мутации. В литературата този период се нарича по различни начини — период на проява, период на фиксиране или период на експресия; краят на този период е моментът на пробовземането (15)(29). След като животното бъде умъртвено, геномната ДНК се изолира от представляващата интерес тъкан или тъкани и се пречиства.

▼ M5

13. Данните за отделна тъкан на животно от множество опаковки/лигирации обикновено се обобщават и честотата на мутантите като цяло се оценява с помощта на общо между 10^5 и 10^7 образуващи плака единици или образуващи колония единици. При използване на методи за положителна селекция общият брой образуващи плака единици се определя с отделен набор неселективни плаки.
14. Разработени са методи за положителна селекция за улесняване на откриването на мутации както в *gpt* гена [*gpt* delta мишка и плъх, *gpt*⁻ фенотип (20)(22)(28)], така и в гена *lacZ* [MutaTMMouse или *lacZ*, съдържащи се в плаزمиди в мишки (3)(10)(11)(30)]; докато мутациите на гена *lacI* в животни Big Blue[®] се откриват чрез неселективен метод, с който мутантите се установяват чрез генериране на оцветени (в синьо) плаки. Методологията за положителна селекция позволява също така и откриване на точкови мутации, възникващи в гена *cII* от вектора совалка на λ бактериофага [Big Blue[®] мишка или плъх, и MutaTMMouse (17)] и мутации чрез делеции в гените λ *red* и *gam* [Spi⁻ селекция при *gpt* delta мишка или плъх (21)(22)(28)]. Честотата на мутантите се изчислява, като се раздели броят на плаките/плазмидите, съдържащи мутации в трансгена, на общия брой плаки/плазмиди, отделени от същата проба от ДНК. При изследванията за генни мутации при TGR честотата на мутантите е докладваният параметър. Освен това дадена честота на мутация може да се определи като дял от клетки, носещи независими мутации; за това изчисление се изисква корекция за клонална експанзия чрез определяне на първичната структура на изолираните мутанти (24).
15. Мутациите, отчитани в изследванията на *lacI*, *lacZ*, *cII* и *gpt* за точкова мутация, се състоят предимно от мутации чрез заместване на двойка бази, мутации с изместване на рамката на разчитане и малки инсерции/делеции. Относителният дял на тези типове мутации сред спонтанните мутации е подобен на този, който се наблюдава в собствения ген *Hprt*. Големи делеции са открити само при изследванията със селекция на Spi⁻ и с плазмиди, съдържащи *lacZ* (24). Представляващите интерес мутации са мутации *in vivo*, които възникват при мишки или плъхове. Мутациите *in vitro* и *ex vivo*, които могат да възникнат по време на отделяне на фаг/плазмид, репликация или репарация, са относително редки и в някои системи могат да бъдат конкретно определени, или изключени от бактерията гостоприемник/системата за положителна селекция.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Подготовка*Избор на животински вид*

16. Понастоящем са налични разнообразни модели за откриване на генни мутации в трансгенни мишки и тези системи са по-широко използвани от моделите с трансгенни плъхове. Ако плъховете са явно подходящ модел от мишките (например при проучване на механизма на карциногенезата за тумор, наблюдаван само при плъхове с оглед съпоставяне с изследване за токсичност при плъхове, или ако е известно, че метаболизмът при плъховете е по-представителен за човешкия метаболизъм) трябва да бъде взето под внимание използването на модели с трансгенни плъхове.

Условия на отглеждане и хранене

17. Температурата в експерименталното помещение с животните трябва в идеалния случай 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 дневната последователност е 12 часа светлина, следвани от 12 часа тъмнина. За храненето могат да

▼ **M5**

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 този път. Животните трябва да бъдат разпределени в малки групи (не повече от пет) от един и същ пол, ако не се очаква агресивно поведение. Животните могат да се настаняват отделно, ако това е научно обосновано.

Подготовка на опитните животни

18. Здрави, млади, полово зрели животни в зряла възраст (на възраст от 8—12 седмици в началото на третирането) се разпределят на случаен принцип в контролни групи и третирани групи. На животните се дава уникална идентификация. Животните се аклиматизират към лабораторните условия поне пет дни. Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. В началото на изследването вариациите в теллото на животните следва да са минимални и да не превишават $\pm 20\%$ от средното телло на всеки пол.

Подготовка на дозите

19. Твърдите изпитвани химикали следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители, или да се смесят в хранителния режим или в питейната вода преди дозирането на животните. Течните изпитвани химикали могат да се дозират директно или да се разреждат преди дозиране. При експозиция чрез инхалация изпитваните химикали могат да се прилагат като газ, пари или аерозол с твърда/течна фаза, в зависимост от техните физични и химични свойства. Следва да се използват пресни смеси на изпитвания химикал, освен ако данните за стабилността показват, че е допустимо съхранение.

Условия на изпитване*Разтворител/носител*

20. Разтворителят/носителят не следва да има токсични ефекти при използването обема на доза, а също така не следва да има съмнения за химическа реакция между него и изпитвания химикал. Ако се използват други освен добре познатите разтворители/носители, включването им следва да се подкрепи от референтни данни за съвместимостта им. Препоръчва се, винаги когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на вода като разтворител/носител.

Положителни контроли

21. Обикновено следва да се използват паралелни положителни контроли с животни. Въпреки това за лаборатории, които са доказали пригодността си (вж. параграф 23) и редовно използват тези изследвания, във всяко изследване може да бъде включена ДНК от предходни третирани като положителни контроли животни за потвърждаване на успешността на метода. Такава ДНК от предходни опити следва да е получена от същите животински видове и представляващи интерес тъкани, и да е съхранявана по подходящ начин (вж. параграф 36). Когато се използват паралелни положителни контроли, не е необходимо прилагането при тях да е по същия път като изпитвания химикал; въпреки това, за положителните контроли следва да е известно, че предизвикват мутации в една или повече тъкани, представляващи интерес във връзка с изпитвания химикал. Дозите на химикали за положителните контроли следва да бъдат подбрани така, че да се получат слаби или умерени ефекти, въз основа на които да може да се извърши критична оценка на параметрите и на чувствителността на изследването. Примери за химикали за положителни контроли и някои от техните прицелни тъкани са включени в таблица 1.

▼ M5

Таблица 1

Примери за химикали за положителни контроли и някои от техните прицелни тъкани

Химикал за положителна контрола и CAS №	Наименование по EINECS и EINECS №	Характеристики	Прицелна тъкан за мутация	
			Плъхове	Мишки
<i>N</i> -етил- <i>N</i> -нитрозоуреа [CAS № 759-73-9]	<i>N</i> -етил- <i>N</i> -нитрозоуреа [212-072-2]	Мутаген с пряко действие	Черен дроб, бял дроб	Костен мозък, колон, епител на колона, черва, черен дроб, бял дроб, далак, бъбреци, гранулозни клетки от яйчниците, мъжки зародишни клетки
Етилкарбамат (уретан) [CAS № 51-79-6]	Уретан [200-123-1]	Мутаген, изисква метаболизъм, но произвежда само слаби ефекти		Костен мозък, предстомах, тънко черво, черен дроб, бял дроб, далак
2,4-диаминотолуен (CAS № 95-80-7)	4-метил- <i>m</i> -фенилендиамин [202-453-1]	Мутаген, изисква метаболизъм, също така положителен в Sp1 ⁻ изследване	Черен дроб	Черен дроб
Бензо[<i>a</i>]пирен (CAS № 50-32-8)	бензо[<i>def</i>]хризен [200-028-5]	Мутаген, изисква метаболизъм	Черен дроб, була,	Костен мозък, гърди, колон, предстомах, жлезист стомах, сърце, черен дроб, бял дроб, мъжки зародишни клетки

Отрицателни контроли

22. Отрицателни контроли, третирани само с разтворител или носител, и в друго отношение третирани по същия начин като третираните групи, следва да се включат за всеки момент на пробовземане. При липсата на преходни или публикувани данни за контроли, показващи, че избраният разтворител/носител не предизвиква никакви неблагоприятни или мутагенни ефекти, за всеки момент на пробовземане следва да бъдат включени и нетретирани контроли, за да се установи допустимостта на контролата на носител.

Проверка на пригодността на лабораторията

23. Пригодността за тези изследвания следва да бъде установена чрез доказване на способността за възпроизвеждане на очаквани резултати от публикувани данни (24) за: 1) честоти на мутантите с химикали за положителни контроли (включително слабите отговори), като например посочените в таблица 1, химикали без мутагенно действие и контроли на носител; и 2) отделяне на трансген от геномна ДНК (например ефикасност на опаковането).

Определяне на първичната структура при мутанти

24. За нормативни цели не се изисква определяне на първичната структура на ДНК на мутанти, в частност когато е получен ясен положителен или отрицателен резултат. Независимо от това данните от определянето на първичната структура могат да бъдат от полза, когато се наблюдават големи колебания между отделните индивиди. В тези случаи определянето на първичната структура може да се използва, за да се изключи възможността за множество мутанти от една мутация или за клониране чрез определяне на дела на уникални мутанти от дадена тъкан. Определяне на първичната структура на приблизително 10 мутанта от тъкан и от животно следва да бъде достатъчно за лесно определяне дали в честотата на мутантите няма включени клонирани мутанти; Определяне на първичната структура на 25 мутанта може да бъде необходимо, за да се коригира математически честотата на мутантите за клоналност. Определяне на първичната структура на мутанти също

▼ **M5**

може да бъде взето под внимание при откриване на неголеми увеличения на честотата на мутантите (т.е. непосредствено над стойностите за нетретираните контроли). Различията в мутационния спектър между колонии от мутанти от третирани и от нетретиран животни могат да подкрепят мутагенен ефект (29). Също така, мутационните спектри могат да бъдат полезни за разработването на механистични хипотези. Когато определянето на първичната структура трябва да бъде включено като част от протокола от изследването, при планирането на такива изследвания следва да се обърне специално внимание, по-специално по отношение на броя на мутантите с определена първична структура в проба, за да се постигне достатъчна статистическа мощност в съответствие с използвания статистически модел (вж. параграф 43).

ПРОЦЕДУРА**Брой и пол на животните**

25. Броят животни в група следва да бъде предварително определен така, че да е достатъчен, за да осигури статистическата мощност, необходима за откриване най-малко на удвояване на честотата на мутантите. Групите са с размер най-малко пет животни; независимо от това, ако статистическата мощност е недостатъчна, броят животни трябва да се увеличи, както се изисква. Обикновено следва да се използват мъжки животни. Може да има случаи, когато би било обосновано изпитването само на женски животни; например, при изпитване на лекарства, специфични за жени, или когато се изследва метаболизъм, специфичен за женския пол. Ако съществуват значителни различия между половете по отношение на токсичността или на метаболизма, тогава се изисква използване и на мъжки, и на женски екземпляри.

Период на прилагане

26. Въз основа на наблюдения, че мутациите се натрупват с всяко третиране, е необходима схема с повтаряща се доза, с ежедневно третиране в продължение на 28 дни. Това по принцип се счита за приемливо както за генериране на достатъчно натрупване на мутации от слаби мутагени, така и за предоставяне на времето на експозиция, подходящо за откриване на мутации в бавно пролифериращи органи. За някои оценки могат да бъдат подходящи алтернативни схеми на третиране, и тези алтернативни графици на дозиране следва да бъдат научно обосновани в протокола. Периодите на третиране не трябва да бъдат по-кратки от времето, необходимо за пълното индуциране на всички относими метаболизиращи ензими, и по-кратки третирания могат да доведат до необходимост от използване на множество моменти на пробовземане, които са подходящи за органи с различни степени на пролиферация. Във всички случаи при обосновката на даден протокол следва да се използва цялата налична информация (например за обща токсичност или метаболизъм и фармакокинетика), особено при отклонение от горните стандартни препоръки. По-дълги от 8 седмици периоди на третиране, въпреки че могат да доведат до увеличаване на чувствителността, следва да бъдат ясно обяснени и обосновани, тъй като дългите периоди на третиране могат да доведат до видимо увеличение на честотата на мутантите чрез клонална експанзия (29).

Нива на доза

27. Нивата на доза следва да се основават на резултатите от изследване за определяне на обхвата на дозите, измерващо общата токсичност, проведено с използване на същия път на експозиция, или на резултатите от предходни изследвания за субакутна токсичност. Нетрансгенните животни от същата порода гризачи могат да се използват за определяне на обхвата на дозите. С цел получаване на информация за зависимостта доза-отговор, основното изпитване следва да включва отрицателна контролна група (вж. параграф 22) и най-малко три, разположени на подходящи интервали, нива на доза, с изключение на случаите, когато е използвана пределната доза (вж. параграф 28).

▼ M5

Най-високата доза следва да е максималната допустима доза (МДД). Най-високата доза се определя като доза, генерираща признаци на такава токсичност, че би могло да се очаква по-високи нива на доза при същия график на дозиране да доведат до леталност. Химикали със специфична биологична активност при ниски, нетоксични дози (като хормони и митогени) и химикали, които показват насищане по отношение на токсикокинетични свойства, могат да бъдат изключения от критериите за определяне на дозата и следва да се оценяват за всеки конкретен случай. Нивата на доза следва да обхващат от максимална до слаба токсичност или липса на токсичност.

Изпитване при пределна концентрация

28. Ако опити за определяне на обхвата на дозите, или съществуващи данни от свързани породи гризачи, показват че режим на третиране най-малко при пределна концентрация (вж. по-долу) не дава забележими токсични ефекти, а генотоксичност не би могла да се очаква на базата на данни от структурно свързани химикали, то тогава пълно изследване с три нива на доза може да не се смята за необходимо. За период на прилагане от 28 дни (т.е. 28 ежедневни третириания) пределната доза е 1 000 mg/kg телесно тегло/ден. За периоди на прилагане от 14 дни или по-кратки пределната доза е 2 000 mg/kg телесно тегло/ден (графици на дозиране, различни от 28 ежедневни третириания, следва да бъдат научно обосновани в протокола; вж. параграф 26).

Прилагане на дозите

29. Изпитваният химикал обикновено се прилага със сонда, като се използва стомашна тръба или подходяща интубационна канюла. Като цяло, при планирането на изследването следва да бъде взет предвид очакваният път на експозиция на човека. Следователно други пътища на експозиция (като например чрез питейна вода, подкожно, интравенозно, локално, чрез вдишване, интратрахеално, чрез хранителен режим или чрез имплантация) могат да бъдат приемливи, ако могат да бъдат обосновани. Интраперитонеалното инжектиране не се препоръчва, тъй като то не е физиологично относим път на експозиция на човека. Максималният обем течност, който може да се приложи еднократно със сонда или инжекция, зависи от големината на изпитваното животно. Обемът не трябва да надвишава 2 ml/100 g телесно тегло. Обеми, по-високи от този, следва да се обосноват. 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 сведено до минимум чрез регулиране на концентрацията с оглед осигуряване на постоянен обем при всички нива на доза.

Момент на пробовземане*Соматични клетки*

30. Моментът на пробовземане е критична променлива, защото се определя от периода, който е необходим за фиксирането на мутациите. Този период е специфичен за дадена тъкан и изглежда е свързан с времето за обновяване на популацията от клетки, като отговорът при костния мозък и червата е бърз, докато отговорът при черния дроб е много по-бавен. Подходящ компромис за измерване на честотите на мутантите както в бързо, така и в бавно пролифериращите тъкани, е 28 последователни ежедневни третириания (както е посочено в параграф 26) и пробовземане три дни след последното третиране; максималната честота на мутантите може обаче да не се прояви в бавно пролифериращите тъкани при тези условия. Ако бавно пролифериращите тъкани са от особено значение, тогава може да бъде по-подходящ по-късен момент на пробовземане — 28 дни след 28-дневния период на прилагане (16)(29). В такива случаи, вторият момент на пробовземане заменя момента на пробовземане след 3 дни, и изисква научна обосновка.

▼ M5

Зародишни клетки

31. Изследванията с TGR са подходящи за изследване на индуцирането на генна мутация в мъжки зародишни клетки (7)(8)(27), за което графикът и кинетиката на сперматогенезата са добре установени (27). Малкият брой яйцеклетки, налични за анализ, дори след свръховулация, както и фактът, че няма синтез на ДНК в овоцити, изключва възможността за определяне на мутации в женските зародишни клетки чрез използване на трансгенни изследвания (31).
32. Моментите на пробовземане за мъжки зародишни клетки следва да се избера така, че да бъдат взети проби в обхвата на експонираните видове клетки по време на развитието на зародишните клетки, и така, че прицелният за пробовземането етап да е получил достатъчна експозиция. Времето за нарастване на развиващите се зародишни клетки от сперматогониални стволни клетки до зрели сперматозоиди, достигнали семепровода/опашката на епидидима, е ~ 49 дни при мишки (36) и ~ 70 дни при плъхове (34)(35). След 28-дневна експозиция с последващи три дни преди момента на пробовземане акумулираните сперматозоиди, събрани от семепровода/опашката на епидидима (7)(8), представляват клетъчна популация, експонирана приблизително по време на втората половина на сперматогенезата, което включва и мейотичния, и постмейотичния период, но не сперматогониалния период или периода на стволните клетки. С цел адекватно пробовземане на клетки в семепровода/опашката на епидидима, които са били сперматогониални стволни клетки по време на периода на експозиция, се изисква допълнителен момент на пробовземане най-малко 7 седмици (мишки) или 10 седмици (плъхове) след прекратяване на третирането.
33. Клетките, получени от семенните каналчета след режима от 28 + 3 дни, изграждат смесена популация, обогатена за всички етапи на развиващите се зародишни клетки (7)(8). Пробовземането на тези клетки за откриването на генна мутация не предоставя оценка на етапите, на които се индуцират мутации в зародишните клетки, която да е толкова точна, колкото тази, която може да се получи при пробовземане на сперматозоиди от семепровода/опашката на епидидима (тъй като от каналчетата се пробовземат редица типове зародишни клетки и има известни количества соматични клетки, замърсяващи тази клетъчна популация). Независимо от това вземането на проби от клетки от семенните каналчета в допълнение към сперматозоидите от семепровода/опашката на епидидима след режим за пробовземане от само 28 + 3 дни ще обхване в известна степен клетки, експонирани през по-голямата част от етапите на развитие на зародишните клетки, и може да бъде полезно за откриване на някои мутагени в зародишни клетки.

Наблюдения

34. Общи клинични наблюдения следва да бъдат извършвани поне един път дневно, за предпочитане по едно и също време всеки ден и като се има предвид пиковият период за поява на очакваните ефекти след дозиране. Здравословното състояние на животните следва да се записва. Поне два пъти дневно всички животни следва да се наблюдават за заболяемост и смъртност. Теглото на всички животни следва да се измерва поне един път в седмицата и при умъртвяването. Консумацията на храна се измерва най-малко един път седмично. Ако изпитваният химикал се прилага чрез водата за пиене, консумацията на вода следва да се измерва при всяка смяна на водата и най-малко един път в седмицата. Животни, проявяващи нелетални признаци на прекалена токсичност, следва да се умъртвят преди приключването на периода на изпитване (23).

▼ M5

Събиране на тъкани

35. Обосновката за събиране на тъкани следва да бъде ясно определена. Тъй като е възможно индуцирането на мутации да бъде изследвано в почти всяка тъкан, изборът на тъкани, които трябва да бъдат събрани, следва да се основава на причината за провеждането на изследването и на всички съществуващи данни за мутагенност, канцерогенност или токсичност на проучвания химикал. Важни фактори за разглеждане следва да включват пътя на прилагане (въз основа на вероятния път или пътища на експозиция на човека), прогнозираното разпределение в тъканите, както и възможния механизъм на действие. При липсата на каквато и да било съпътстваща информация следва да бъдат събрани няколко соматични тъкани, които могат да представляват интерес. Те следва да представляват бързо пролифериращите, бавно пролифериращите тъкани и тъканите от местата на контакт. В допълнение, сперматозоидите от семенпровода/опашката на епидидима и развиващите се зародишни клетки от семенните каналчета (както е описано в параграфи 32 и 33) следва да се събират и съхраняват в случай че се изисква бъдещ анализ за мутагенност за зародишни клетки. Теглото на органите следва да бъде измерено, като за по-големите органи от всички животни следва да бъде взета една и съща площ.

Съхранение на тъкани и ДНК

36. Тъканите (или тъканните хомогенати) следва да се съхраняват при температура – 70 °C или по-ниска, и да се използват за изолиране на ДНК в рамките на 5 години. Изолираната ДНК, съхранявана в охладено състояние при 4 °C в подходящ буфер, следва да се използва оптимално за анализ на мутации в рамките на 1 година.

Селекция на тъкани за анализ на мутанти

37. Изборът на тъкани трябва да бъде основан на съображения като: 1) пътя на прилагане или мястото на първия контакт (напр. жлезист стомах при прилагане по орален път, бял дроб при прилагане чрез инхалация, или кожа при локално прилагане); и 2) наблюдаваните фармакокинетични параметри в изследвания за обща токсичност, които показват свързаното с тъканта елиминиране, задържане или натрупване, или прицелните органи за токсичността. Ако са извършени последващи изследвания за канцерогенност, трябва да бъдат взети под внимание прицелните тъкани за канцерогенност. Изборът на тъкани за анализ следва да увеличи до максимум откриването на химикали, които са мутагени с пряко действие *in vitro*, бързо метаболизират, имат висока реактивоспособност или се абсорбират слабо, или онези, за които прицелната тъкан се определя от пътя на прилагане (6).
38. При липсата на съпътстваща информация и като се вземе предвид мястото на контакт, дължащо се на пътя на прилагане, черният дроб и още поне една тъкан с висока скорост на протичане на деленето (напр. жлезист стомах, костен мозък) следва да бъдат оценени за мутагенност. В повечето случаи горепосочените изисквания могат да се постигнат от анализи на две внимателно подбрани тъкани, но в някои случаи ще са необходими три или повече. Ако има причини за конкретна загриженост относно ефектите върху зародишните клетки, включително положителни отговори при соматични клетки, следва тъкани от зародишни клетки да бъдат оценени за мутации.

Методи за измерване

39. Стандартни лабораторни или публикувани методи за откриване на мутанти са на разположение за препоръчаните трансгенни модели: ламбда бактериофаги и плазмиди, носещи *lacZ* (30); мишки, носещи *lacI* (2)(18); мишки, носещи *gpt delta* (22); плъхове, носещи *gpt delta* (28); *cII* (17). Измененията следва да бъдат обосновани и надлежно документирани. Данните от множество опаковки могат да бъдат обобщени и използвани за постигане на достатъчен брой плаки или колонии. Независимо от това, необходимостта от голям брой реакции

▼ M5

по опаковане за постигане на достатъчен брой плаки може да е показател за наличието на ниско качество на ДНК. В такива случаи към данните трябва да се подхожда предпазливо, тъй като те могат да са ненадеждни. Оптималният общ брой плаки или колонии от проба ДНК се регулира от статистическата вероятност за откриване на достатъчен брой мутанти при дадена честота на мутанти при спонтанна мутация. Като цяло се изискват най-малко 125 000 до 300 000 плаки, ако честотата на мутанти при спонтанна мутация е от порядъка на 3×10^{-5} (15). За изследването с Big Blue®, носещи *lacI*, е важно да се докаже, че целият набор от фенотипове на мутанти с определен цвят може да бъде открит посредством включването на подходящи контроли с определен цвят паралелно с всяко поставяне в гнезда. Тъканите и получените проби (единици) следва да бъдат обработени и анализирани с използването на блокова схема, в която елементите от контролната група на разтворител/носител, положителната контролна група (ако се използва) или положителната контролна ДНК (където е уместно) и всяка една от третираните групи се обработват заедно.

ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

Обработка на резултатите

40. Индивидуалните данни за животните следва да се представят в таблица. Опитната единица е животното. Докладът следва да включва общия брой образуващи плака единици (pfu) или образуващи колония единици (cfu), броя на мутантите, и честотата на мутантите за всяка тъкан от всяко животно. Ако има множество реакции на опаковане/изолиране, следва да се докладва броят на реакциите на проба от ДНК. Макар че данните за всяка отделна реакция трябва да бъдат съхранени, само общите pfu или cfu трябва да бъдат докладвани. Трябва да бъдат докладвани данните за токсичност и клиничните признаци, както е посочено в параграф 34. Трябва да бъдат представени всички резултати от определянето на първичната структура за всеки анализиран мутант, и да бъдат посочени изчисленията на честотата на мутация в резултат от тях за всяко животно и тъкан.

Статистическа оценка и тълкуване на резултатите

41. Има няколко критерия за определяне на положителен резултат, като например свързано с дозата увеличение на честотата на мутантите или явно увеличение на честотата на мутантите в група с еднократна доза в сравнение с контролната група на разтворител/носител. Най-малко три третиран с определена доза групи трябва да бъдат анализирани, за да бъдат получени достатъчно данни за анализ доза-отговор. Независимо от това, че първостепенното съображение следва да е биологичната относимост, могат да се използват подходящи статистически методи като помощно средство за оценката на резултатите от изпитването (4)(14)(15)(25)(26). При използването статистически изпитвания за опитна единица следва да се счита животното.
42. Изпитван химикал, за който резултатите не удовлетворяват горните критерии, се смята за немутагенен в настоящото изследване. За биологичната относимост на даден отрицателен резултат следва да бъде потвърдена експозицията на тъканта.
43. За подпомагане при тълкуването на резултатите от анализите за определяне на първичната структура на ДНК на разположение са редица статистически подходи (1)(5)(9)(19).
44. Проучването дали наблюдаваните стойности са в рамките на контролния обхват от предходни изследвания, или извън него, може да осигури насоки при оценката на биологичната значимост на отговора (32).

▼ M5**Доклад от изпитването**

45. Докладът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал:

- данни за идентификация и CAS №, ако са известни;
- източник, номер на партидата, при наличност;
- физическа природа и чистота;
- физични и химични свойства, относими към провеждането на изследването;
- стабилност на изпитвания химикал, ако е известна;

Разтворител/носител:

- обосновка за избора на носител;
- разтворимост и стабилност на изпитвания химикал в разтворител/носител, ако са известни;
- изготвяне на рецептурите за хранителен режим, питейна вода или инхалация;
- аналитични определяния, свързани с рецептурите (напр. устойчивост, хомогенност, номинални концентрации);

Изпитвани животни:

- използван вид/порода и обосновка за избора;
- брой, възраст и пол на животните;
- източник, условия на отглеждане, хранителен режим и т.н.;
- индивидуално тегло на животните в началото на изпитването, в т.ч. обхват на телесното тегло, средни стойности и стандартно отклонение за всяка група;

Условия на изпитване:

- положителни и отрицателни (носител/разтворител) контролни данни;
- данни от изследването за установяване на обхвата;
- обосновка за избора на нивото на доза;
- подробности за приготвянето на изпитвания химикал;
- подробна информация относно прилагането на изпитвания химикал;
- обосновка на пътя на прилагане;
- методи за измерване на токсичността за животните, включително, когато е необходимо, хистопатологични или хематологични анализи и честота, с която са правени наблюдения върху животните или е измервано телесното тегло;
- методи за проверка дали изпитваният химикал е достигнал до прицелната тъкан, или до общото кръвообращение, ако са получени отрицателни резултати;

▼ M5

- действителна доза (mg/kg телесно тегло дневно), изчислена от концентрацията на изпитвания химикал в хранителния режим/пийтейната вода (ppm), и консумация, ако е приложимо;
- подробности относно качество на храната и водата;
- подробно описание на графици на третиране и вземане на проби и обосновки за направения избор;
- метод за умъртвяване;
- процедури за изолиране и съхраняване на тъкани;
- методи за изолиране на геномна ДНК на гризачи, отделяне на трансгена от геномната ДНК и включване на трансгенна ДНК в бактерия гостоприемник;
- източник и номера на партии за всички клетки, комплекти и реагенти (когато е приложимо);
- методи за изброяване на мутантите;
- методи за молекулярен анализ на мутанти и използване при корекция за клоналност и/или изчисляване на честоти на мутация, ако е приложимо;

Резултати:

- състояние на животните преди и през целия период на изпитване, включително признаци на токсичност;
- телесно тегло и тегло на органи при умъртвяването;
- за всяка тъкан/животно — брой на мутантите, брой на оценените плаки или колонии, честота на мутантите;
- за всяка тъкан/група животни — брой на реакциите на опаковане на проба от ДНК, общ брой на мутантите, средна честота на мутантите, стандартно отклонение;
- взаимоотношение доза-отговор, където е възможно;
- за всяка тъкан/животно — брой на независимите мутанти и средна честота на мутация, където е бил извършен молекулярен анализ;
- паралелни отрицателни контролни данни и отрицателни контролни данни от предишни изследвания, с обхвати, средни стойности и стандартни отклонения;
- паралелни положителни контролни данни (или ДНК от предходно третиране като положителни контроли животни);
- аналитични определения, ако има такива (например концентрации на ДНК, използвани при пакетирание, данни за определяне на първичната структура на ДНК);
- статистически анализи и използвани методи;

*Обсъждане на резултатите**Заклучение*

▼ M5

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Adams, W.T. and T.R. Skopek (1987), 'Statistical Test for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol.*, 194: 391-396.
- (2) Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', *Mutation Res.*, 518: 107-112.
- (3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations' *Nature*, 377(6550): 657-659
- (4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen.*, 25(3): 246-255.
- (5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', *Environ. Mol. Mutagen.*, 28: 405-413.
- (6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens', *Mutagenesis*, 14(1): 141-151.
- (7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485-7489.
- (8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', *Mutation Res.*, 388(2-3): 197-212.
- (9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', *Genetics*, 156: 1411-1418.
- (10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo*', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(20): 7971-7975.
- (11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), 'A Selective System for *lacZ*-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host', *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.
- (12) Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res.*, 543: 125-136.
- (13) Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, 705: 96-106.
- (14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), 'Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', *Mutagenesis*, 13(3): 249-255.
- (15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J. Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 253-259.
- (16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), 'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1-6.

▼ M5

- (17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), 'Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073–9078.
- (18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, *in vivo* Mutagenicity Testing', *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 7(8): 212–218.
- (19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', *Carcinogenesis*, 29(4): 772-778.
- (20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi⁻ — and 6-thioguanine Selections', *Environ. Mol. Mutagen.*, 28(4): 465–470.
- (21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), 'Spi⁻ Selection: an Efficient Method to Detect γ -ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen.*, 34(1): 9–15.
- (22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.
- (23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, № 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, № 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.
- (25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', *Environ. Mol. Mutagen.*, 25(3): 231–245.
- (26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', *Mutation. Res.*, 388(2–3): 249–289.
- (27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', *Mutation. Res.*, 598: 164-193.
- (28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), 'Integration of *in vivo* Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: *in vivo* Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', *Toxicol. Sci.*, 114(1): 71-78.
- (29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res.*, 540: 141-151.
- (30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid lacZ Transgenic Mice for studying Mutations *in vivo*' in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II*, Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 391–410.

▼ M5

- (31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), 'A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res.*, 578(1-2): 117-123.
- (32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', *Mutation Res.*, doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.
- (33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, № 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Paris.
- (34) Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal'. *Physiol. Rev.* 52: 198-236.
- (35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M. Wassarman (eds.), *Physiology of Reproduction*, Elsevier, the Netherlands, pp. 1071-1148.
- (36) Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', *Genetica*, 122: 25-36.

▼ **M5***Допълнение***ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

Период на прилагане: общият период, в продължение на който е дозирано дадено животно.

Заместване на двойка бази: тип мутация, която води до заместване на една отделна нуклеотидна база от ДНК с друга нуклеотидна база от ДНК.

Капсид: белтъчната обвивка, в която е обвита вирусна частица.

Химикал: вещество или смес.

Клонална експанзия: производството на много клетки от една отделна клетка (мутант).

Образуваща колония единица (cfu): измерителна единица за броя жизнеспособни бактерии.

Конкатемер: дълга непрекъсната биомолекула, образувана чрез конкатенация на множество идентични копия.

Sos-място: Състоящ се от 12 нуклеотида сегмент от едноверижна ДНК, разположен в двата края на двуверижния геном на бактериофаг ламбда.

Делеция: мутация, при която геномът изгубва един или повече (последователни) нуклеотиди.

Електропорация: прилагането на електрически импулси за увеличаване на пропускливостта на клетъчната мембрана.

Собствен ген: ген, който е присъщ на генома.

Свърхдисперсия: вариране в повтарящите се очаквания за част от популация, което е по-голямо, отколкото очакваното за популация с биномно разпределение.

Мутация с изместване на рамката на разчитане: гenna мутация в рамките на кодираща протеин/пептид ДНК последователност, причинена от инсерции или делеции на брой нуклеотиди, който не е делим без остатък на три.

Инсерция: добавянето на една или повече нуклеотидни двойки бази в ДНК последователност.

Множество мутанти от една мутация (jackpot): голям брой мутанти, които са възникнали чрез клонална експанзия от една мутация.

Големи делеции: делеции в ДНК на повече от няколко килобази (които се откриват ефективно с изследвания със селекция на Spr^{-} и с плазмиди, съдържащи *lacZ*).

Лигиране: ковалентно свързване на два края на ДНК молекула с използване на ДНК-лигаза.

Митоген: химикал, който стимулира клетка за започване на клетъчното делене чрез задействане на митозата (т.е. клетъчното делене).

Неутрален ген: ген, който не е повлиян от положителен или отрицателен селекционен натиск.

Опаковане: синтез на инфекциозни фагови частици от смес от фагов капсид, протеини от опашката и конкатемер на фагови ДНК молекули. Обикновено се използва за опаковане на клонирана ДНК в ламбда вектор (отделена с *sos*-места) в инфекциозни ламбда частици.

Ефикасност на опаковането: ефикасността, с която опакованите бактериофаги се изолират в бактерията гостоприемник.

▼ M5

Образуваща плака единица (pfu): измерителна единица за броя жизнеспособни бактериофаги.

Точкова мутация: общ термин за мутация, която засяга само малка ДНК последователност, включително малки инсерции, делеции и замествания на двойка бази.

Положителна селекция: метод, който позволява да оцелеят само мутантите.

Репортерен ген: ген, чийто продукт (ген с мутация) се открива лесно.

Момент на пробовземане: край на периода от време, предхождащ умъртвяването, през който химикалът не се прилага, и по време на който нерепарираните повреди в ДНК се фиксират в стабилни мутации.

Вектор совалка: вектор, устроен по такъв начин, че да може да се разпространява в два гостоприемника от различен вид; съответно, включена във вектор совалка ДНК може да бъде изпитвана или манипулирана в два различни типа клетки или в два различни организма.

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

Трансгенен: който произхожда от, или е свързан с, или представлява организъм, чийто геном е бил изменен чрез пренос на ген или гени от друг вид.

▼ M7**Б.59. IN CHEMICO КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ДИРЕКТНА РЕАКЦИОННА СПОСОБНОСТ СПРЯМО ПЕПТИДИ (DPRA)****ВЪВЕДЕНИЕ**

Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 442С (2015). Кожният сенсibilизатор е вещество, което води до алергичен отклик след контакт с кожата, както е определено от Глобалната хармонизирана система на ООН за класифициране и етикетироване на химикали (GHS) (1) на Съвета за сигурност на ООН и от Регламент (ЕО) № 1272/2008 относно класифицирането, етикетироването и опаковането на вещества и смеси (CLP)⁽¹⁾. Настоящият метод за изпитване обхваща процедура *in chemico* (изследване за директна реакционна способност спрямо пептиди — DPRA), която да се използва за подкрепа на разграничаването между кожни сенсibilизатори и непредизвикващи сенсibilизация вещества в съответствие с GHS на ООН и Регламента CLP.

Налице е общо съгласие по отношение на основните биологични събития, които са в основата на кожната сенсibilизация. Съществуващите знания за химичните и биологичните механизми, свързани с кожната сенсibilизация, бяха обобщени под формата на път, водещ до неблагоприятен ефект (АОР) (2), от молекулното инициращо събитие през междинните събития до неблагоприятния ефект, а именно алергичния контактен дерматит при хората или свръхчувствителността при контакт при гризачи. В рамките на свързания с кожната сенсibilизация АОР, молекулното инициращо събитие е ковалентното свързване на електрофилните вещества към нуклеофилните центрове в белтъците на кожата.

Оценката на кожната сенсibilизация обикновено е включвала използването на лабораторни животни. Класическите методи с използване на морски свинчета — изпитването на Magnusson—Kligman върху морски свинчета с максимизиране и изпитването на Buehler (метод за изпитване Б.6 (3)) — изследват както индукционната фаза, така и фазата на предизвикване на кожната сенсibilизация. Изпитването върху локални лимфни възли (LLNA) на мишки (LLNA, методът за изпитване Б.42 (4)) и двете му нерадиоактивни изменения: LLNA: DA (МИ Б.50 (5)) и LLNA: BrdU-ELISA (метод за изпитване Б.51 (6)), всички от които оценяват изключително индуктивния отговор, също са възпрети, тъй като спрямо изпитванията върху морски свинчета предоставят предимство по отношение на хуманното отношение към животните, както и обективно измерване на индукционната фаза на кожната сенсibilизация.

Неотдавна методи за изпитване *in chemico* и *in vitro* на механистична основа бяха приети за научно валидни за оценка на химикали от гледна точка на опасността от кожна сенсibilизация. Независимо от това, с оглед на ограничения механистичен обхват по отношение на АОР, на всеки от наличните понастоящем методи за изпитване без използването на животни (2) (7), в рамките на Интегрираните подходи за изпитване и оценка (IATA) ще са необходими комбинации от методи без използване на животни (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*), за да могат в пълна степен да бъдат заменени използваните понастоящем изпитвания върху животни.

DPRA е предложено с оглед на анализа на молекулното инициращо събитие на свързания с кожната сенсibilизация АОР, а именно реакционната способност спрямо белтъци, чрез количествено определяне на реакционната способност на изпитваните химикали спрямо примерни синтетични пептиди, съдържащи лизин или цистеин (8). Впоследствие стойностите на процентното изчерпване на цистеинсъдържащи и лизинсъдържащи пептиди се използват, за да се категоризира дадено вещество в една от четири категории реакционна способност за подпомагане на разграничаването на кожни сенсibilизатори и непредизвикващи сенсibilизация вещества (9).

⁽¹⁾ Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 г. относно класифицирането, етикетироването 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).

▼ M7

DPRA е било обект на оценка в изследване за валидиране, водено от референтна лаборатория на ЕС за алтернативи на изпитванията върху животни (EURL ECVAM), и последваща независима партньорска проверка от ESAC (консултативният научен комитет на EURL ECVAM), и DPRA е прието за научно валидно (10) за използване като част от IATA за подпомагане на разграничаването на кожни сенсibiliзатори и непредизвикващи сенсibiliзация вещества, за целите на класифицирането в класовете на опасност и на етикетирването. Примери за използването на данни от DPRA в комбинация с друга информация са описани в литературата (11) (12) (13) (14).

Определенията са дадени в допълнение I.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ, ПРИЛОЖИМОСТ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Корелацията между реакционната способност спрямо белтъци и потенциала за кожна сенсibiliзация е добре установена (15) (16) (17). Независимо от това, тъй като свързването с белтъци представлява само едно основно събитие, макар и да е молекулното инициращо събитие на свързания с кожната сенсibiliзация AOP, информацията за реакционната способност спрямо белтъци, генерирана с изпитвания и с методи, различни от изпитване, може да не е достатъчна сама по себе си, за да се направи заключение за отсъствие на потенциал за кожна сенсibiliзация в химикалите. Ето защо данните, събрани с настоящия метод за изпитване, следва да се разглеждат в контекста на интегрирани подходи, като например IATA, като се комбинират с друга допълнителна информация, например информация, получена от химични аналози от *in vitro* изследвания, фокусирани върху други основни събития от AOP, свързан с кожната сенсibiliзация, както и от методи, различни от изпитвания, включително асоцииране (read-across).

Настоящият метод за изпитване може да се използва в съчетание с друга допълнителна информация в подкрепа на разграничаването между кожните сенсibiliзатори (категория 1 по GHS на ООН/Регламент CLP) и непредизвикващите сенсibiliзация вещества в контекста на IATA. Настоящият метод за изпитване не може да се използва самостоятелно нито за определяне на подкатегории 1A и 1B за кожните сенсibiliзатори съгласно определението по GHS на ООН/Регламент CLP, нито за прогнозиране на потенциала при решения във връзка с оценката на безопасността. Независимо от това, в зависимост от регулаторната рамка, положителният резултат с DPRA може да се използва самостоятелно за класифициране на даден химикал в категория 1 по GHS на ООН/Регламент CLP.

Методът за изпитване DPRA е доказано прехвърляем към лаборатории с опит в областта на анализа чрез високоефективна течна хроматография (HPLC). Нивото на възпроизводимостта в прогнозите, които могат да се очакват от метода за изпитване, е от порядъка на 85 % вътре в самата лаборатория и 80 % между лабораториите (10). Резултатите, получени при изследването за валидиране (18) и публикуваните изследвания (19) сочат, че точността на DPRA при разграничаването между кожните сенсibiliзатори (т.е. категория 1 по GHS на ООН/Регламент CLP) и непредизвикващите сенсibiliзация е 80 % (N=157) с чувствителност от 80 % (88/109) и специфичност 77 % (37/48), в сравнение с резултатите от LLNA. При DPRA подценяването при прогнозиране на химикалис малък до умерен потенциал (т.е. кожна сенсibiliзация подкатегория 1B по GHS на ООН/Регламент CLP) е по-вероятно, отколкото при химикали, показващи голяма потенциал за кожна сенсibiliзация (т.е. подкатегория 1A по GHS на ООН/Регламент CLP) (18) (19). Независимо от това стойностите за точността, посочени тук за DPRA като самостоятелен метод за изпитване, са само ориентировъчни, тъй като методът за изпитване трябва да се разглежда в съчетание с други източници на информация в контекста на IATA и в съответствие с разпоредбите на точка 9 по-горе. Освен това при оценяването на методи за сенсibiliзация на кожата, които не използват животни, следва да се има предвид, че LLNA изпитването, както и други изпитвания върху животни, могат да не отразяват напълно положението при вида, представляващ интерес, т.е. при хората. Въз основа на цялостните налични данни бе показано, че DPRA е приложимо по отношение на изпитвани химикали, които обхващат различни органични функционални групи, механизми за отговор, потенциал за сенсibiliзация на кожата (както е определена в *in vivo* проучвания) и физични и химични свойства (8) (9) (10) (19). Взета заедно, тази информация показва ползата от DPRA за подпомагане на определянето на опасността от кожна сенсibiliзация.

▼ M7

В настоящия метод за изпитване терминът „изпитван химикал“ се използва за позоваване на това, което се изпитва, и не е свързан с приложимостта на DPRA за изпитване на вещества и/или смеси. Настоящият метод за изпитване не е приложим за изпитване на метални съединения, тъй като за тях е известно, че реагират с белтъци по механизми, различни от ковалентното свързване. Изпитваният химикал следва да бъде разтворим в подходящ разтворител при крайна концентрация от 100 mM (виж точка 18). Независимо от това, изпитваните химикали, които не са разтворими при тази концентрация, могат да се изпитват при по-ниски концентрации на разтвори. В такъв случай даден положителен резултат все още може да бъде използван за подпомагане на идентифицирането на изпитвания химикал като кожен сенсibiliзатор, но от отрицателен резултат не следва да се прави окончателно заключение за отсъствието на реакционна способност. Понастоящем информацията за приложимостта на DPRA за смеси с известен състав е ограничена (18) (19). Независимо от това DPRA се смята за технически приложим за изпитването на вещества с повече съставки и на смеси с известен състав (вж. точка 18). Преди използването на настоящия метод за изпитване по отношение на смес с цел генериране на данни за планирана регулаторна цел следва да се разгледа въпросът дали той може да даде адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо. Такива съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа. Сегашният модел на прогнозиране не може да бъде използван за сложни смеси с неизвестен състав или за вещества с непознат или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали (т.е. UVCB вещества) поради определеното моларно отношение на изпитвания химикал и пептида. За тази цел ще трябва да бъде разработен нов модел за прогнозиране въз основа на гравиметричен подход. В случаите, в които могат да бъдат представени доказателства за неприложимостта на метода за изпитване по отношение на други специфични категории химикали, методът за изпитване следва да не се използва за тези специфични категории химикали.

Настоящият метод за изпитване е метод *in chemico*, който не включва метаболитна система. Химикалите, които изискват ензимно биоактивиране за проявяване на потенциала си за кожна сенсibiliзация (т.е. про-хаптени), не могат да бъдат откривани от метода за изпитване. Съобщава се, че химикали, които стават сенсibiliзатори след абиотична трансформация (т.е. пре-хаптени), в някои случаи са правилно откривани от метода за изпитване (18). В светлината на изложеното по-горе отрицателните резултати, получени по метода за изпитване, следва да се тълкуват в контекста на посочените ограничения, както и във връзка с други източници на информация в рамките на IATA. Изпитвани химикали, които не се свързват ковалентно с пептида, но подпомагат окисляването му (например димеризация на цистеина) биха могли да доведат до потенциално надценяване на пептидното изчерпване, което води до възможни неверни положителни прогнози и/или до решения за класифициране в по-висок клас реакционна способност (вж. точки 29 и 30).

Както е описано, DPRA подкрепя разграничаването на кожни сенсibiliзатори и непредизвикващи сенсibiliзация вещества. Той обаче може да допринесе за оценка на потенциала за сенсibiliзация (11), когато се използва в интегрирани подходи, като например IATA. Независимо от това се изисква по-нататъшна работа, за предпочитане въз основа на данни за човека, за определяне на това как резултатите от DPRA могат евентуално да послужат за информация за оценка на потенциала.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

DPRA е *in chemico* метод, който определя количествено остатъчната концентрация на цистеинсъдържащ или лизинсъдържащ пептид след 24-часова инкубация с изпитвания химикал при $25 \pm 2,5$ °C. Синтетичните пептиди съдържат фенилаланин за подпомагане на откриването. Относителната пептидна концентрация се определя чрез високоефективна течна хроматография (HPLC) с градиентно елуиране и UV откриване при 220 nm. След това стойностите на процентното изчерпване на цистеинсъдържащи и лизинсъдържащи пептиди се изчисляват и се използват в прогнозен модел (вж. точка 29), който дава възможност за отнасяне на изпитвания химикал в един от четири класа за реакционна способност, използвани в подкрепа на разграничаването на сенсibiliзатори и непредизвикващи сенсibiliзация вещества.

▼ M7

Преди рутинното използване на метода, описан в настоящия метод за изпитване, лабораториите следва да докажат техническата си компетентност, като използват десетте вещества за изпитването за пригодност, изброени в допълнение 2.

ПРОЦЕДУРА

Настоящият метод за изпитване се основава на DB-ALM Протокол № 154 за DPRА (20), който е протоколът, използван за изследването за валидиране, координирано от EURL ECVAM. Препоръчва се този протокол да се използва при прилагането и използването на метода в лабораторни условия. По-долу е представено описание на основните компоненти и процедури за DPRА. Ако се използва алтернативен план за HPLC, трябва да бъде доказана неговата еквивалентност с валидирания план, описан в DB-ALM протокола (например чрез изпитване на веществата за изпитването за пригодност, изброени в допълнение 2).

Приготвяне на цистеинсъдържащ и лизинсъдържащ пептид

Изходни разтвори на цистеин (Ac-RFAACAA-COOH) и лизин (Ac-RFAAKAA-COOH), съдържащи синтетични пептиди с чистота над 85 % и за предпочитане в обхвата 90-95 %, трябва да бъдат пряко приготвени непосредствено преди инкубирането им с изпитвания химикал. Крайната концентрация на цистеинсъдържащия пептид следва да бъде 0,667 mM в фосфатен буфер с pH 7,5, а крайна концентрация на лизинсъдържащия пептид следва да бъде 0,667 mM в буфер амониев ацетат с pH 10,2. Аналитичните серии на анализа с HPLC следва да се планират така, че анализът с HPLC да отнема по-малко от 30 часа. За планирането на HPLC, използвано в изследването за валидиране и описано в настоящия метод за изпитване, в една отделна HPLC серия могат да бъдат включени до 26 проби (които включват изпитвания химикал, положителната контрола и подходящия брой контроли на разтворител въз основа на броя на отделните разтворители, използвани в изпитването, всяко от тях изпитвано в три повторения). За всички повторения, анализирани в една и съща серия, следва да се използват идентични изходни разтвори на цистеинсъдържащи и лизинсъдържащи пептиди. Препоръчително е преди да се използват индивидуалните партиди от пептиди, да се докаже подходящата им разтворимост.

Приготвяне на изпитвания химикал

Разтворимостта на изпитвания химикал в подходящ разтворител следва да бъде определена преди извършването на изследването, като се следва процедурата по разтваряне, описана в DB-ALM протокола за DPRА (20). Подходящият разтворител ще разтвори изпитвания химикал напълно. Тъй като в DPRА изпитваният химикал се инкубира в голям излишък на цистеинсъдържащия или на лизинсъдържащия пептид, визуалната проверка за образуването на бистър разтвор се счита за достатъчна за гарантиране, че изпитваният химикал (и всички негови компоненти в случай на изпитване на вещество с повече съставки или на смес) е разтворен. Подходящи разтворители са ацетонитрил, вода, 1:1 смес вода:ацетонитрил, изопропанол, ацетон или смес в съотношение 1:1 ацетон:ацетонитрил. Могат да бъдат използвани други разтворители, когато те не оказват влияние върху стабилността на пептида, при наблюдение с референтни контроли С (т.е. проби, състоящи се само от пептида, разтворен в подходящ разтворител; виж допълнение 3). Като последна възможност, ако изпитваният химикал не е разтворим в никой от посочените разтворители, следва да се направи опит за разтварянето му в 300 µl DMSO и за разреждане на получения разтвор с 2 700 µl ацетонитрил, и ако изпитваният химикал не е разтворим в тази смес, следва да се направят опити за разтваряне на същото количество от изпитвания химикал в 1 500 µl DMSO и да се разреди получения разтвор с 1 500 µl ацетонитрил. Изпитваният химикал следва да бъде предварително претеглен в стъклени флакони и разтворен непосредствено преди изпитването в подходящ разтворител, за изготвяне на 100 mM разтвор. За смеси и за вещества, включващи повече съставки с известен състав, една чистота следва да се определи от сбора от дяловете на нейните съставки (с изключение на вода), и едно привидно молекулно тегло трябва да се определи, като се отчетат отделните молекулни тегла на всяка съставка в сместа (с изключение на вода) и техните дялове. След това получените

▼ **M7**

чистота и привидно молекулно тегло трябва да се използват за изчисляване на теглото на изпитвания химикал, необходимо за изготвяне на 100 mM разтвор. За полимери, за които не може да бъде определено преобладаващо молекулно тегло, за изготвяне на 100 mM разтвор може да се вземе предвид молекулното тегло на мономера (или привидното молекулното тегло на различните мономери, съставляващи полимера). Независимо от това, при изпитването на смеси, вещества с повече съставки или полимери с известен състав, също следва да се вземе предвид изпитване на чистия химикал. За течности чистият химикал трябва да бъде изпитван като такъв, без предварително разреждане, чрез инкубирането му при моларно отношение от 1:10 и 1:50 съответно с цистеинсъдържащите и лизинсъдържащите пептиди. За твърди вещества изпитваният химикал следва да се разтвори в максималната си концентрация на разтваряне в същия разтворител, който е използван за приготвяне на разтвора с привидна концентрация 100 mM. След това той трябва да бъде изпитван като такъв, без последващо разреждане, чрез инкубирането му при моларно отношение от 1:10 и 1:50 съответно с цистеинсъдържащите и лизинсъдържащите пептиди. Непротиворечивите резултати (наличие или отсъствие на реакция) между разтвора с привидна концентрация 100 mM и чистия химикал следва да позволят да се направи категорично заключение относно резултата.

Приготвяне на положителната контрола, референтните контроли и контролите за коелуиране

Канелен алдехид (CAS 104-55-2; $\geq 95\%$ чистота) за хранителни цели следва да бъде използван като положителна контрола (ПК) при концентрация от 100 mM в ацетонитрил. Могат да се използват други подходящи положителни контроли, за предпочитане даващи стойности на изчерпването в средата на обхвата, ако са налични данни за предходни периоди, от които могат да се изведат сравними критерии за приемливост на серията. Освен това в аналитичната серия за анализа с HPLC следва също така да се включат референтни контроли (т.е. проби, съдържащи само пептида, разтворен в подходящия разтворител), като те се използват за проверка на пригодността на HPLC системата преди анализа (референтни контроли А), стабилността на референтните контроли във времето (референтни контроли В) и за проверка дали разтворителят, използван за разтваряне на изпитвания химикал, не оказва влияние върху процентното изчерпване на пептиди (референтни контроли С) (вж. допълнение 3). Подходящата референтна контрола за всеки химикал се използва, за да се изчисли процентното изчерпване на пептиди за този химикал (вж. точка 26). Освен това в серията трябва да бъде включена контрола за коелуиране, състояща се само от изпитвания химикал поотделно за всеки от изпитваните химикали, за откриване на евентуално коелуиране на изпитвания химикал с лизинсъдържащия или с цистеинсъдържащия пептид.

Инкубиране на изпитвания химикал с разтворите на лизинсъдържащия и цистеинсъдържащия пептиди

Разтворите на цистеинсъдържащия и лизинсъдържащия пептид трябва да бъдат инкубирани в стъклени автоматични дозатори с изпитвания химикал в съотношение 1:10 и 1:50 съответно. Ако се наблюдава утайка незабавно след добавяне на разтвора на изпитвания химикал в разтвор на пептида, поради малка разтворимост във вода на изпитвания химикал, в този случай не е сигурно колко от изпитвания химикал е останал в разтвора за реакция с пептида. Ето защо в такъв случай положителният резултат би могъл все още да се използва, но отрицателният резултат е несигурен и следва да се тълкува внимателно (вж. също така разпоредбите в точка 11 за изпитването на химикали, които не се разтварят до концентрация от 100 mM). Разтворът с реагентите следва да бъде оставен на тъмно при температура $25 \pm 2.5^\circ\text{C}$ за 24 ± 2 часа преди стартирането на HPLC анализа. Всеки изпитван химикал следва да бъде анализиран в три повторения и за двата пептида. Пробите трябва да се проверят визуално преди HPLC анализа. Ако се образува утайка или се наблюдава разделяне на фази, пробите могат да се центрофугират при ниска скорост (100-400xg), за да се предизвика утаяване на дъното на флакона като предпазна мярка, тъй като големите количества утайка могат да задръстят тръбичките и колоните при HPLC. Ако след инкубационния период се наблюдава утаяване или разделяне на фазите, пептидното изчерпване може да бъде подценено и в случай на отрицателен резултат не може да се направи заключение с достатъчна сигурност за отсъствието на реакционна способност.

▼ **M7****Построяване на стандартната калибрационна крива за HPLC**

Следва да бъде генерирана стандартна калибрационна крива както за цистеинсъдържащия, така и за лизинсъдържащия пептид. Пептидните еталони следва да се приготвят в разтвор от 20 % или 25 % ацетонитрил: буфер, с използване на фосфатен буфер (pH 7,5) за цистеинсъдържащия пептид, и буфер амониев ацетат (pH 10,2) за лизинсъдържащия пептид. Чрез еталони, получени след поредица от разреждания на пептидния изходен разтвор (0,667 mM), следва да се приготвят 6 калибрационни разтвора, които да покриват обхвата от 0,534 до 0,0167 mM. В стандартната калибрационна крива следва също да бъде включена празна проба от буфера за разреждане. Подходящите калибрационни криви трябва да са с $r^2 > 0,99$.

Подготовка и анализ с HPLC

Пригодността на системата за HPLC следва да се провери преди извършването на анализа. Пептидното изчерпване се контролира чрез HPLC с UV детектор (детектор с фотодиодна матрица или абсорбционен детектор с фиксирана дължина на вълната 220 nm). Съответната колона се инсталира в системата за HPLC, описан във валидирания протокол, като предпочитана колона се използва Zorbax SB-C-18 2,1 mm × 100 mm × 3,5 микрона. С тази колона за високоефективна течна хроматография с обърната фаза цялата система трябва да се уравни при 30 °C с 50 % фаза А (0,1 % v/v трифлуорооцетна киселина във вода) и 50 % за фаза Б (0,085 % v/v трифлуорооцетна киселина в ацетонитрил) най-малко 2 часа преди стартирането. HPLC анализът трябва да бъде извършен при скорост на потока 0,35 ml/min и линеен градиент от 10 % до 25 % ацетонитрил в продължение на 10 минути, последван от бързо нарастване до 90 % ацетонитрил за отстраняване на други материали. Следва да се инжектират равни обеми от всеки еталон, проба и контрола. Колоната трябва да бъде повторно уравнивана на първоначалните условия в продължение на 7 минути между инжектиранията. Ако се използва различна колона за HPLC с обърната фаза, може да се наложи планираните параметри, описани по-горе, да се коригират, за да се гарантира подходящо елуиране и интегриране на цистеинсъдържащите и лизинсъдържащите пептиди, а също и обема на инжектиране, който може да варира според използваната система (обикновено в интервала от 3-10 µl). Важно е, ако се използва алтернативен план за HPLC, да бъде доказана неговата еквивалентност с валидирания план, описан по-горе (например чрез изпитване на веществата за изпитването за пригодност, изброени в допълнение 2). Абсорбцията се наблюдава при 220 nm. Ако се използва детектор с фотодиодна матрица, следва да бъде записана също и абсорбцията при 258 nm. Следва да се отбележи, че някои доставки на ацетонитрил могат да окажат отрицателно въздействие върху пептидната стабилност и това трябва да бъде оценено, когато се използва нова партида ацетонитрил. Отношението на площта на пика при 220 nm и площта на пика при 258 nm може да бъде използвано като показател за коелуиране. За всяка проба съотношение в интервала от 90 % < средна стойност ⁽¹⁾ на отношението на площите за контролните проби <100 % би било добър показател за това, че не е имало коелуиране.

Може да има изпитвани химикали, които да подпомагат окисляването на цистеинсъдържащия пептид. Пикът на пептида, съдържащ димеризиран цистеин, може да бъде наблюдаван визуално. Ако изглежда, че е настъпила димеризация, това следва да се отбележи, тъй като процентът на пептидно изчерпване може да бъде надценен, което да доведе до неверни положителни прогнози и/или класифициране в по-висок клас за реакционна способност (вж. точки 29 и 30).

Анализът с HPLC за цистеинсъдържащи и лизинсъдържащи пептиди може да се извършва паралелно (ако са налични две системи за HPLC) или в различни дни. В случай че анализът се провежда в различни дни, всички разтвори с изпитвани химикали следва да бъдат пряно приготвени за двете изследвания през съответния ден на провеждането. Графикът за анализа следва да бъде изготвен така, че да се гарантира, че инжектирането на първата проба започва от 22 до 26 часа след смесването на изпитвания химикал с пептидния разтвор. Аналитичните серии на анализа с HPLC следва да се планират така, че анализът с HPLC да отнема по-малко от

⁽¹⁾ В настоящия документ под средна стойност се разбира средното аритметично.

▼ **M7**

30 часа. За планирането на HPLC, използвано в изследването за валидиране и описано в настоящия метод за изпитване, в една отделна HPLC серия могат да бъдат включени до 26 проби (вж. също точка 17). Пример за серия за анализ с HPLC е даден в приложение 3.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Оценка на данните**

Концентрацията на цистеинсъдържащия или на лизинсъдържащия пептид се определя фотометрично при 220 nm във всяка проба чрез измерване на площта на подходящите пикове (площ под кривата, AUC) и чрез изчисляване на концентрацията на пептида, като се използва линейната калибрационна крива, получена от еталоните.

Процентът на пептидно изчерпване се определя във всяка проба, като се измерва площта на пика и стойността на тази площ се разделя на средната пикова площ на относимата референтна контрола С (вж. допълнение 3) съгласно формулата, описана по-долу.

$$\text{Процент пептидно изчерпване} = \left[1 - \left(\frac{\text{Пикова площ на пептида в повторението}}{\text{Средна пикова площ на пептида в рефер. контроли С}} \right) \right] \times 100$$

Критерии за приемливост

Следните критерии трябва да бъдат изпълнени, за да се счита за валидна дадена серия:

- а) стандартната калибрационна крива трябва да е с $r^2 > 0,99$.
- б) средната стойност на процента на пептидно изчерпване на трите повторения за положителната контрола канелен алдехид трябва да е между 60,8 % и 100 % за цистеинсъдържащия пептид, между 40,2 % и 69,0 % за лизинсъдържащия пептид, максималното стандартно отклонение (SD) за повторенията на положителната контрола трябва да е < 14,9 % за процента на изчерпване на цистеина и < 11,6 % за процента на изчерпване на лизина, и
- в) средната пептидна концентрация на референтните контроли А следва да бъде $0,50 \pm 0,05$ mM, а коефициентът на вариация (CV) на пептидните пикови площи за деветте референтни контроли В и С в ацетонитрил следва да бъде < 15,0 %.

Ако един или повече от тези критерии не е изпълнен, серията следва да се повтори.

Следните критерии трябва да бъдат изпълнени, за да се приемат за валидни резултатите от изпитването на даден химикал:

- а) максималното стандартно отклонение за повторенията от изпитвания химикал следва да са < 14,9 % за процента на изчерпване на цистеина и < 11,6 % за процента на изчерпване на лизина,
- б) средната пептидна концентрация на трите референтни контроли С в подходящия разтворител следва да бъде $0,50 \pm 0,05$ mM. Ако тези критерии не са изпълнени, данните следва да бъдат отхвърлени и серията трябва да се повтори за конкретния изпитван химикал.

Модел на прогнозиране

Средният процент на изчерпване на цистеина и процентът изчерпване на лизина се изчислява за всеки изпитван химикал. Отрицателното изчерпване се смята за „0“ при изчисляването на средната стойност. Чрез използване на модела на прогнозиране цистеин 1:10/лизин 1:50, показан в таблица 1, за подпомагане на разграничаването на кожни сенсibiliзатори и непредизвикващи сенсibiliзация вещества в рамките на IATA следва да се използва праг от 6,38 % средно пептидно изчерпване. Възможно е прилагането на модела на прогнозиране за отнасяне на даден изпитван химикал към клас за реакционна способност (т.е. ниска, умерена и висока реакционна способност) да предостави полезна информация за оценка на потенциала в рамките на IATA.

▼ **M7**

Таблица 1

Модел на прогнозиране цистеин 1:10/лизин 1:50 ⁽¹⁾

Средна стойност на процентното изчерпване на цистеина и лизина	Клас на реакционна способност	Прогнозиране по DPRA ⁽²⁾
$0\% \leq$ среден % изчерпване $\leq 6,38\%$	Нулева или минимална реакционна способност	Отрицателен резултат
$6,38\% <$ среден % изчерпване $\leq 22,62\%$	Ниска реакционна способност	Положителен резултат
$22,62\% <$ среден % изчерпване $\leq 42,47\%$	Умерена реакционна способност	
$42,47\% <$ среден % изчерпване $\leq 100\%$	Висока реакционна способност	

⁽¹⁾ Числата се отнасят до статистически генерирани прагови стойности и не са свързани с точността на измерването.

⁽²⁾ Прогнозирането по DPRA следва да се разглежда в рамките на IATA и в съответствие с разпоредбите на точки 9 и 12.

Може да има случаи, при които изпитваният химикал (веществото или една или няколко от съставките на вещество с повече съставки или смес) има значителна абсорбция при дължина на вълната 220 nm и е със същото време на задържане като пептида (коелуиране). Коелуирането може да бъде избягнато чрез леко адаптиране на плана за HPLC с оглед допълнително разделяне на времето за елуиране на изпитвания химикал и на пептида. Ако за избягване на коелуирането се използва алтернативен план за HPLC, трябва да бъде доказана неговата еквивалентност с валидирания план (например чрез изпитване на веществата за изпитването за пригодност, изброени в допълнение 2). Ако се наблюдава коелуиране, пикът на пептида не може да бъде интегриран и изчисляването на процента пептидно изчерпване не е възможно. Ако коелуиране на такива изпитвани химикали се наблюдава както при цистеинсъдържащия, така и при лизинсъдържащия пептид, тогава анализът следва да бъде протоколиран като „недостатъчен за формулиране на заключение“. В случаите, когато се наблюдава коелуиране само с лизинсъдържащия пептид, тогава може да се използва модел на прогнозиране цистеин 1:10, даден в таблица 2.

Таблица 2

Модел на прогнозиране цистеин 1:10 ⁽¹⁾

Процент изчерпване на цистеина (Cys)	Клас на реакционна способност	Прогнозиране по DPRA ⁽²⁾
$0\% \leq$ процент изчерпване на Cys $\leq 13,89\%$	Нулева или минимална реакционна способност	Отрицателен резултат
$13,89\% <$ процент изчерпване на Cys $\leq 23,09\%$	Ниска реакционна способност	Положителен резултат
$23,09\% <$ процент изчерпване на Cys $\leq 98,24\%$	Умерена реакционна способност	
$98,24\% <$ процент изчерпване на Cys $\leq 100\%$	Висока реакционна способност	

⁽¹⁾ Числата се отнасят до статистически генерирани прагови стойности и не са свързани с точността на измерването.

⁽²⁾ Прогнозирането по DPRA следва да се разглежда в рамките на IATA и в съответствие с разпоредбите на точки 9 и 12.

Може да има други случаи, при които припокриването във времето на задържане между изпитвания химикал и един от двата пептида е непълно. В такива случаи стойностите на процентното пептидно изчерпване могат да бъдат оценени и използвани в модела на прогнозиране цистеин 1:10/лизин 1:50, но независимо от това отнасянето на изпитвания химикал към даден клас на реакционна способност не може да се извърши с точност.

▼ **M7**

Когато резултатът за даден изпитван химикал е недвусмислен, еднократен анализ с HPLC следва да е достатъчен както за цистеинсъдържащия, така и за лизинсъдържащия пептид. Независимо от това това, в случай на резултати, които се доближават до прага, използван за разграничаване на положителните от отрицателните резултати (т.е. гранични резултати), може да е необходимо допълнително изпитване. При ситуации, в които средната стойност на процента на изчерпване попада в интервала от 3 % до 10 % за модел на прогнозиране цистеин 1:10/лизин 1:50, или процентното изчерпване на цистеина попада в интервала от 9 % до 17 % за модел на прогнозиране цистеин 1:10, следва да се разгледа възможността за провеждане на втора серия, както и на трета серия в случай на наличие на несъответстващи резултати между първите две серии.

Протокол от изпитването

Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал

- Вещество с една съставка
 - Химична идентификация, като наименование(я) по IUPAC или по CAS, CAS номер(а), SMILES или InChI код, структурна формула, и/или други идентификатори;
 - Външен вид, разтворимост във вода, молекулно тегло и допълнителни относими физични и химични свойства, според наличността;
 - Чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и т.н.;
 - Обработка преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
 - изпитвана концентрация (концентрации);
 - Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични.
- Вещество с повече съставки, UVCB и смес:
 - характеризиране, доколкото е възможно, чрез химическата идентичност (вж. по-горе), чистотата, количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките (вж. по-горе), доколкото са налични.
 - Външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства, според наличността;
 - Молекулно тегло или привидно молекулно тегло в случай на смеси/полимери с известен състав или друга информация, относима към провеждането на изследването;
 - Обработка преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
 - Изпитвана концентрация (концентрации);
 - Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични.

Контроли

- Положителна контрола:
 - Химична идентификация, като наименование(я) по IUPAC или по CAS, CAS номер(а), SMILES или InChI код, структурна формула, и/или други идентификатори;
 - Външен вид, разтворимост във вода, молекулно тегло и допълнителни относими физични и химични свойства, според наличността;
 - Чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и т.н.;

▼ M7

- Обработка преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
- Изпитвана концентрация (концентрации);
- Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични;
- Препратка към резултатите за положителните контроли за предходни периоди, доказващи подходящи критерии за приемливост на серията, ако е приложимо.
- Разтворител/носител
 - Използван разтворител/носител и съотношение на съставките му, ако е приложимо;
 - Химична идентификация или идентификации, като наименование(я) по IUPAC или по CAS, CAS номер(а) и/или други идентификатори;
 - Чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и т.н.;
 - Външен вид, молекулно тегло и допълнителни относими физични и химични свойства, в случай че са използвани разтворители/носители, различни от упоменатите в метода за изпитване и в зависимост от наличността;
 - Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични;
 - Обосновка за избора на разтворител за всеки изпитван химикал;
 - За ацетонитрила, резултати от изпитването за въздействие върху стабилността на пептида.

Приготвяне на пептидите, положителната контрола и изпитвания химикал

- Характеризиране на пептидните разтвори (доставчик, партида, точно тегло на пептида, добавен обем за изходния разтвор);
- Характеризиране на положителния контролен разтвор (точно тегло на веществото за положителна контрола, добавен обем за разтвора за изпитване);
- Характеризиране на разтворите на изпитвания химикал (точно тегло на изпитвания химикал, добавен обем за разтвора за изпитване);

Настройка на уреда за HPLC и анализ

- Тип уред за HPLC, колони за HPLC и предпазни колони, детектор, автоматичен дозатор;
- Параметри, относими към анализа с HPLC, като например температура на колоната, обеми на инжектиране, скорост на потока и градиент.

Пригодност на системата

- Площ на пика за пептида при 220 nm за всяко повторение на еталон и на референтна контрола A;
- Линейна калибрационна крива, представена графично, и протоколирана стойност на r^2 ;
- Пептидна концентрация за всяко повторение на референтна контрола A;
- Средна пептидна концентрация (mM) от трите референтни контроли A, SD и CV;
- Пептидна концентрация на референтни контроли A и C.

▼ M7*Аналитична серия*

- За референтните контроли:
 - Площ на пика за пептида при 220 nm за всяко повторение на референтни контроли В и С;
 - Средна площ на пика на пептида при 220 nm на деветте референтни контроли В и С в ацетонитрил, SD и CV (за стабилност на референтните контроли за периода на анализа);
 - За всеки използван разтворител, средна площ на пика на пептида при 220 nm на трите съответни референтни контроли С (за изчисляване на процента на пептидно изчерпване);
 - За всеки използван разтворител, пептидната концентрация (mM) на трите съответни референтни контроли С;
 - За всеки използван разтворител, средната пептидна концентрация (mM) на трите съответни референтни контроли С, SD и CV.
- За положителната контрола:
 - Площ на пика за пептида при 220 nm за всяко повторение;
 - Процент пептидно изчерпване за всяко повторение;
 - Среден процент пептидно изчерпване за трите повторения, SD и CV.
- За всеки изпитван химикал:
 - Външен вид на утайката в реакционната смес в края на инкубационния период, ако се наблюдава. Дали утайката е повторно разтворена или центрофугирана;
 - Наличие на коелуиране;
 - Описание на всякакви други относими наблюдения, ако е приложимо;
 - Площ на пика за пептида при 220 nm за всяко повторение;
 - Процент пептидно изчерпване за всяко повторение;
 - Среден процент пептидно изчерпване за трите повторения, SD и CV.
 - Средна стойност от стойностите на процента на изчерпване на цистеина и процента на изчерпване на лизина;
 - Използван модел на прогнозиране и прогноза по DPRA.

Изпитване за пригодност

- Ако е приложимо, процедурата, използвана за доказване на пригодността на лабораторията за извършване на метода за изпитване (например чрез изпитване на вещества за изпитването за пригодност), или за доказване на възпроизводимостта на характеристиките на метода за изпитване във времето.

Обсъждане на резултатите

- Обсъждане на резултатите, получени с метода за изпитване DPRA;
- Обсъждане на резултатите от метода за изпитване в контекста на IATA, ако е налична друга относима информация.

Заклучение

▼ M7

ЛИТЕРАТУРА

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. На разположение на адрес: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.
- (3) Глава Б.6 от настоящото приложение: Кожна сенсibiliзация.
- (4) Глава Б.42 от настоящото приложение: Изследване на локалните лимфни възли
- (5) Глава Б.50 от настоящото приложение: Кожна сенсibiliзация: изследване на локалните лимфни възли: DA.
- (6) Глава Б.51 от настоящото приложение: Кожна сенсibiliзация: изследване на локалните лимфни възли: BrdU-ELISA
- (7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.
- (8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.
- (9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.
- (10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. На разположение на адрес: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra>
- (11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.
- (12) Bauch *et al.* (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489-504.
- (13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicology *in vitro* 27:609-618.
- (14) Ball *et al.* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60:389-400.
- (15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625-639.
- (16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.
- (17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.
- (18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Достъпно на: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

▼ M7

- (19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.
- (20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Достъпно на: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- (22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Достъпно на: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf—138
- (23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

▼ **M7***Допълнение 1*

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: степента на близост между резултатите от метода за изпитване и приетите референтни стойности. Това е мярка за характеристиките на метода за изпитване и аспект на „относимостта“. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съответствие“, за да се обозначи относителният дял на правилните резултати при даден метод за изпитване (21).

АОР (път, водещ до неблагоприятен ефект): Последователност от събития от химичната структура на целеви химикал или група от сходни химикали през молекулното инициращо събитие до представляващ интерес *in vivo* резултат (2).

Калибрационна крива: Връзката между опитните стойности на отклика и аналитичната концентрация (наричана също *стандартна крива*) на познато вещество.

Химикал: Вещество или смес.

Коефициент на вариация: Мярка за варирането, която се изчислява за група от данни от повторения, като се раздели стандартното отклонение на средната стойност. Той може да бъде умножен по 100 за изразяване в проценти.

Опасност: Вътрешно присъщо свойство на даден агент или ситуация, притежаващо потенциал да предизвика неблагоприятни ефекти, когато един организъм, система или (суб-)популация бъдат експонирани на този агент.

ИАТА (интегриран подход за изпитване и оценка): Структуриран подход, използван за идентифициране на опасност (потенциал), характеризиране на опасност (потенциал) и/или оценка на безопасността (потенциал и експозиция) на даден химикал или група от химикали, който стратегически интегрира и претегля всички данни, относими към предоставянето на информация за вземането на регулаторно решение по отношение на потенциалната опасност и/или риска, и/или необходимостта от допълнително целенасочено и следователно минимално изпитване.

Молекулно инициращо събитие: Предизвикано от химикал смущение в дадена биологична система на молекулно равнище, идентифицирано като стартиращо събитие за причинно-следствената последователност, водеща до неблагоприятен ефект.

Смес: Смес или разтвор, съставена (съставен) от две или повече вещества, в която (който) те не си взаимодействат (1).

Вещество с една съставка: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който съдържанието на една основна съставка е най-малко 80 % (w/w).

Вещество с повече съставки: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който повече от една основна съставка се съдържа в концентрация $\geq 10\%$ (w/w) и $< 80\%$ (w/w). Веществото с повече съставки е резултат от производствен процес. Разликата между смес и вещество с повече съставки е, че дадена смес е получена чрез смесване на две или повече вещества без химична реакция. Веществото с повече съставки е резултат от химична реакция.

Положителна контрола: Повторение, съдържащо всички компоненти на дадена изпитвана система и третирано с вещество, за което е известно, че предизвиква положителен отклик. За да се гарантира, че може да се направи оценка на варирането на отклика в положителната контрола във времето, големината на положителния отклик не следва да е прекомерна.

Референтна контрола: Нетретирана проба, съдържаща всички компоненти на дадена изпитвана система, включително разтворителя или носителя, която се обработва с пробите, третирани с изпитвания химикал, и с други

▼ M7

контролни проби, за определяне на базовия отклик при пробите, третиран с изпитвания химикал, разтворен в същия разтворител или носител. Когато се изпитва с паралелна отрицателна контрола, тази проба показва също дали разтворителят или носителът взаимодействат с изпитваната система.

Относимост: описание на взаимовръзката между изпитването и ефекта, представляващ интерес, и дали тя е значима и полезна за определена цел. Това е степента, в която изпитването правилно измерва или прогнозира биологичния ефект, представляващ интерес. Относимостта включва разглеждането на точността (съответствието) на метода за изпитване (21).

Надеждност: мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да се приложи възпроизводимо в една и съща лаборатория и в различни лаборатории по различно време, при използване на един и същи протокол. Оценката за нея се прави, като се изчислява вътрешнолабораторната и междулабораторната възпроизводимост и вътрешнолабораторната повторяемост (21).

Възпроизводимост: Съгласуваността между резултатите, получени чрез изследване на един и същ химикал, като се използва един и същ протокол за изпитване (вж. надеждност) (21).

Чувствителност: Относителният дял на всички положителни/активни химикали, които са класифицирани правилно чрез метода за изпитване. Това е мярка за точността на метода за изпитване, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на относимостта на метода за изпитване (21).

Специфичност: Относителният дял на всички отрицателни/неактивни химикали, които са класифицирани правилно чрез метода за изпитване. Това е мярка за точността на метода за изпитване, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на относимостта на метода за изпитване (21).

Вещество: химичен елемент и неговите съединения в естествено състояние или получени чрез всеки производствен процес, включително всяка добавка, необходима за запазване на стабилността на продукта и всеки примес, извлечен от използвания процес, с изключение на всеки разтворител, който може да бъде отделен, без да се засяга стабилността на веществото или да се променя неговият състав (1).

Пригодност на системата: Определяне на характеристиките на уреда (напр. чувствителност) чрез анализ на референтен еталон преди извършването на анализ на аналитичната партида (22).

Изпитван химикал: Терминът „изпитван химикал“ се използва за обозначаване на онова, което се изпитва.

Глобална хармонизирана система на Организацията на обединените нации за класифициране и етикетирание на химикали (GHS на ООН): система, предлагаща класифициране на химикали (вещества и смеси) според стандартизирани видове и степени на физическа, здравна и екологична опасност и разглеждаща съответни съобщителни елементи, като например пиктограми, сигнални думи, предупреждения за опасност, препоръки за безопасност и информационни листове за безопасност, така че те да съобщават информация за тяхното неблагоприятно въздействие с оглед защита на хората (включително работодатели, работещи, служители в транспорта, потребители и аварийни служители) и на околната среда (1).

UVCB: Вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали.

Валиден метод за изпитване: Метод за изпитване, за който се смята, че притежава достатъчна относимост и надеждност по отношение на конкретна цел и който се основава на научно обосновани принципи. Даден метод за изпитване никога не е валиден в абсолютен смисъл, а само по отношение на определена цел (21).



Допълнение 2

ВЕЩЕСТВА ЗА ИЗПИТВАНЕ ЗА ПРИГОДНОСТ

***In chemico* кожна сенсibiliзация: Изследване за директна реакционна способност спрямо пептиди**

Преди рутинното използване на настоящия метод за изпитване, лабораториите следва да докажат техническата си компетентност, като правилно получат очакваната прогноза по DPRA за 10-те вещества за изпитване за пригодност, препоръчани в Таблица 1, и чрез получаване на стойности за изчерпването на цистеина и лизина, които попадат в съответния референтен обхват за 8 от 10-те вещества за изпитване за пригодност за всеки пептид. Тези вещества за изпитване за пригодност са подбрани като представителни за размаха от отклици за опасностите от кожна сенсibiliзация. Други критерии за подбор са били, че те са налични в търговската мрежа, че са налични висококачествени *in vivo* референтни данни и че са налични висококачествени *in vitro* данни, генерирани с метода за изпитване DPRA, и че са били използвани в изследването за валидиране, координирано от EURL ECVM, за доказване на успешното прилагане на метода за изпитване в лабораториите, участващи в изследването.

Таблица 1

Препоръчвани вещества за изпитване за пригодност за доказване на техническата компетентност по отношение на изследването за директна реакционна способност спрямо пептиди

Вещества за изпитване за пригодност	CASRN	Агрегатно състояние	<i>In vivo</i> прогноза (1)	Прогноза по DPRA (2)	Обхват (3) на процентното изчерпване на цистеинсъдържащ пептид	Обхват (3) на процентното изчерпване на лизинсъдържащ пептид
2,4-динитрохлоробензен	97-00-7	Твърдо	Сенсibiliзатор (изключително силен)	Положителен резултат	90-100	15-45
Оксазолон	15646-46-5	Твърдо	Сенсibiliзатор (изключително силен)	Положителен резултат	60-80	10-55
Формалдехид	50-00-0	Течно	Сенсibiliзатор (силен)	Положителен резултат	30-60	0-24
Бензилиденацетон	122-57-6	Твърдо	Сенсibiliзатор (умерен)	Положителен резултат	80-100	0-7
Фарнезал	19317-11-4	Течно	Сенсibiliзатор (слаб)	Положителен резултат	15-55	0-25
2,3-Бутандион	431-03-8	Течно	Сенсibiliзатор (слаб)	Положителен резултат	60-100	10-45
1-Бутанол	71-36-3	Течно	Непредизвикващ сенсibiliзация	Отрицателен резултат	0-7	0-5,5
6-Метилкумарин	92-48-8	Твърдо	Непредизвикващ сенсibiliзация	Отрицателен резултат	0-7	0-5,5
Млечна киселина	50-21-5	Течно	Непредизвикващ сенсibiliзация	Отрицателен резултат	0-7	0-5,5
4-Метоксиацетофенон	100-06-1	Твърдо	Непредизвикващ сенсibiliзация	Отрицателен резултат	0-7	0-5,5

(1) *In vivo* прогнозите за опасност и (потенциал) се основават на данни от LLNA (19). *In vivo* потенциалът е изведен с използване на критериите, предложени от ЕСЕТОС (23).

(2) Прогнозирането по DPRA следва да се разглежда в рамките на IATA и в съответствие с разпоредбите на точки 9 и 11.

(3) Обхвати, определени въз основа на минимум 10 стойности на изчерпването, генерирани от 6 независими лаборатории.

▼ M7

Допълнение 3

ПРИМЕРИ ЗА АНАЛИТИЧНА СЕРИЯ

Еталони за калибриране и референтни контроли	ЕТАЛ1 ЕТАЛ2 ЕТАЛ3 ЕТАЛ4 ЕТАЛ5 ЕТАЛ6 Буфер за разреждане Референтна контрола А, повт 1 Референтна контрола А, повт 2 Референтна контрола А, повт 3
Контроли за коелуиране	Контрола за коелуиране 1 за изпитван химикал 1 Контрола за коелуиране 2 за изпитван химикал 2
Референтни контроли	Референтна контрола В, повт 1 Референтна контрола В, повт 2 Референтна контрола В, повт 3
Първи набор от повторения	Референтна контрола С, повт 1 Канелен алдеhid, повт 1 Проба 1, повт 1 Проба 2, повт 1
Втори набор от повторения	Референтна контрола С, повт 2 Канелен алдеhid, повт 2 Проба 1, повт 2 Проба 2, повт 2
Трети набор от повторения	Референтна контрола С, повт 3 Канелен алдеhid, повт 3 Проба 1, повт 3 Проба 2, повт 3
Референтни контроли	Референтна контрола В, повт 4 Референтна контрола В, повт 5 Референтна контрола В, повт 6

В аналитичната серия следва да бъдат включени три набора от референтни контроли (т.е. проби, съставени само от пептида, разтворен в подходящ разтворител):
Референтна контрола А: използвана за проверка на пригодността на системата за HPLC.

Референтна контрола В: включена в началото и в края на аналитичната серия, за да се провери стабилността на референтните контроли през периода на извършване на анализа.

Референтна контрола С: включена в аналитичната серия, за да се провери дали разтворителят, използван за разваряне на изпитвания химикал, не оказва въздействие върху процента на пептидно изчерпване.

▼ **M7****Б.60. IN VITRO КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ ARE-NRF2 ЛУЦИФЕРАЗА****ВЪВЕДЕНИЕ**

Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 442D (2015). Кожният сенсibilизатор представлява вещество, което води до алергичен отклик след контакт с кожата, както е определено от Глобалната хармонизирана система на ООН за класифициране и етикетирание на химикали (GHS) (1) на Съвета за сигурност на ООН и от Регламент (ЕО) № 1272/2008 относно класифицирането, етикетирането и опаковането на вещества и смеси (CLP) (1). Настоящият метод за изпитване обхваща *in vitro* процедура (изследване ARE-Nrf2 луцифераза), която да се използва за подкрепа на разграничаването между кожни сенсibilизатори и непредизвикващи сенсibilизация вещества в съответствие с GHS на ООН (1) и Регламента CLP.

Налице е общо съгласие по отношение на основните биологични събития, които са в основата на кожната сенсibilизация. Съществуващите знания за химичните и биологичните механизми, свързани с кожната сенсibilизация, бяха обобщени под формата на път, водещ до неблагоприятен ефект (AOP) (2), започващ от молекулното инициращо събитие през междинните събития до неблагоприятния за здравето ефект, а именно алергичния контактен дерматит при хората или свръхчувствителността при контакт при гризачи (2) (3). Молекулното инициращо събитие е ковалентното свързване на електрофилните вещества към нуклеофилните центрове в белтъците на кожата. Второто основно събитие в този AOP се извършва в кератиноцитите и включва възпалителни реакции, както и гена експресия, свързана със специфични сигнални пътища в клетките, като например пътищата, зависими от елемент за антиоксидантен отговор/отговор на електрофилно въздействие (ARE). Третото основно събитие е активирането на дендритни клетки, обичайно оценявано по експресията на специални повърхностни клетъчни маркери, хемокини и цитокини. Четвъртото основно събитие е Т-клетъчна пролиферация, която се оценява непряко чрез изследването на локални лимфни възли на мишки (4).

Оценката на кожната сенсibilизация обикновено е включвала използването на лабораторни животни. Класическите методи с използване на морски свинчета — изпитването на Magnusson—Kligman върху морски свинчета с максимизиране и изпитването на Buehler (метод за изпитване Б.6 (5)) — изследват както индукционната фаза, така и фазата на предизвикване на кожната сенсibilизация. Изпитването върху локални лимфни възли (LLNA) на мишки (LLNA, метод за изпитване Б.42 (4)) и двете му нерадиоактивни изменения: LLNA: DA (МИ Б.50 (6)) и LLNA: BrdU-ELISA (метод за изпитване Б.51 (7)), всички от които оценяват изключително индуктивния отговор, също са възприети, тъй като предоставят предимства спрямо изпитванията върху морски свинчета по отношение както на хуманното отношение към животните, така и на обективното измерване на индукционната фаза на кожната сенсibilизация.

Неотдавна *in chemico* и *in vitro* методи за изпитване на механистична основа бяха приети за научно валидни за оценка на химикали от гледна точка на опасността от кожната сенсibilизация. Независимо от това, с оглед на ограничения механистичен обхват по отношение на AOP, на всеки от наличните понастоящем методи за изпитване без използването на животни (2) (3), в рамките на Интегрираните подходи за изпитване и оценка (IATA) ще са необходими комбинации от методи без използване на животни (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*), за да могат в пълна степен да бъдат заменени използваните понастоящем изпитвания върху животни.

Настоящият метод за изпитване (изследване ARE-Nrf2 луцифераза) се предлага за разглеждане на второто основно събитие, както е обяснено в точка 2. За кожните сенсibilизатори е установено, че индуцират гени, които се регулират от елемента, активиращ се в отговор на антиоксидантно въздействие (ARE) (8) (9). Нискомолекулни електрофилни вещества като кожните сенсibilизатори могат да въздействат върху рецепторния белтък

(1) Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 г. относно класифицирането, етикетирането 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).

▼ **M7**

Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), например чрез ковалентно изменение на неговия цистеинов остатък, което води до неговата дисоциация от транскрипционния фактор Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). След това дисоциираният Nrf2 може да активира ARE-зависими гени, като например тези, които кодират ензими от фаза II от детоксикацията (8) (10) (11).

Понастоящем единственото *in vitro* изследване ARE-Nrf2 луцифераза, обхванато от настоящия метод за изпитване, е изследването KeratinoSens™, за което са извършени изследвания за валидиране (9) (12) (13), последвани от независима партньорска проверка, извършена от референтната лаборатория на ЕС за алтернативи на изпитванията върху животни (EURL ECVAM) (14). Изследването KeratinoSens™ беше прието за научно валидно за използване като част от IATA за подпомагане на разграничаването на кожни сенсibiliзатори и непредизвикващи сенсibiliзация вещества, за целите на класифицирането в класовете на опасност и на етикетиранията (14). Лабораториите, които желаят да прилагат метода за изпитване, могат да получат рекомбинантната клетъчна линия, използвана в изследването KeratinoSens™, чрез лицензионно споразумение с разработилия метода за изпитване (15).

Определенията са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ, ПРИЛОЖИМОСТ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Тъй като активирането на пътя Keap1-Nrf2-ARE разглежда само второто основно събитие от AOP, свързан с кожната сенсibiliзация, малко е вероятно информацията от методи за изпитване, основана на активирането на този път, да е достатъчна, когато е използвана самостоятелно, за да се направи заключение относно потенциала за кожна сенсibiliзация на химикалите. Ето защо данните, събрани с настоящия метод за изпитване, следва да се разглеждат в контекста на интегрирани подходи, като например IATA, като се комбинират с друга допълнителна информация, като например информация, получена от химични аналози от изследвания *in vitro*, фокусирани върху други основни събития от AOP, свързан с кожната сенсibiliзация, както и от методи, различни от изпитвания, включително асоцииране (read-across). Примери за това как да се използва методът за изпитване ARE-Nrf2 луцифераза в комбинация с друга информация, са описани в литературата (13) (16) (17) (18) (19).

Настоящият метод за изпитване може да се използва в подкрепа на разграничаването между кожните сенсibiliзатори (т.е. категория 1 по GHS на ООН/Регламент CLP) и непредизвикващите сенсibiliзация вещества в контекста на IATA. Настоящият метод за изпитване не може да се използва самостоятелно за определяне на подкатегории 1A и 1B за кожните сенсibiliзатори съгласно определението по GHS на ООН/Регламент CLP, нито за прогнозиране на потенциала при решения във връзка с оценката на безопасността. Независимо от това, в зависимост от регулаторната рамка, даден положителен резултат може да се използва самостоятелно за класифициране на даден химикал в категория 1 по GHS на ООН/Регламент CLP.

Въз основа на набора от данни от изследването за валидиране и изпитване и на вътрешно извършеното изпитване, използвано за независимата партньорска проверка на метода на изпитване, бе доказано, че изследването KeratinoSens™ може да се прилага и в лаборатории с опит в клетъчните култури. Нивото на възпроизводимостта в прогнозите, които могат да се очакват от метода за изпитване, е от порядъка на 85 % вътре в самата лаборатория и между лабораториите (14). Точността (77 % — 155/201), чувствителността (78 % — 71/91) и специфичността (76 % — 84/110) на изследването KeratinoSens™ при разграничаването между кожните сенсibiliзатори (т.е. категория 1 по GHS на ООН/Регламент CLP) и непредизвикващите сенсibiliзация вещества, при сравнение с резултатите от

▼ M7

LLNA, са изчислени, като са взети предвид всички данни, представени на EURL ECVAM за оценка и партньорска проверка на метода за изпитване (14). Тези стойности са подобни на онези, които бяха публикувани наскоро въз основа на вътрешно изпитване на около 145 вещества (77 % точност, 79 % чувствителност, 72 % специфичност) (13). При изследването KeratinoSens™ е по-вероятно подценяване при прогнозиране на химикали, които са с малък до умерен потенциал за кожна сенсibilизация (т.е. кожна сенсibilизация подкатегория 1B по GHS на ООН/Регламент CLP), отколкото при химикали, показващи голям потенциал за кожна сенсibilизация (т.е. подкатегория 1A по GHS на ООН/Регламент CLP) (13) (14). Взета като цяло, тази информация показва ползата от изследването KeratinoSens™ за подпомагане на определянето на опасността от кожна сенсibilизация. Независимо от това стойностите за точността, посочени тук за изследването KeratinoSens™ като самостоятелен метод за изпитване, са само ориентировъчни, тъй като методът за изпитване трябва да се разглежда в съчетание с други източници на информация в контекста на IATA и в съответствие с разпоредбите на точка 9 по-горе. Освен това при оценяването на методи за сенсibilизация на кожата, които не използват животни, следва да се има предвид, че LLNA, както и други изпитвания върху животни, могат да не отразяват напълно положението при вида, представляващ интерес, т.е. при хората.

В настоящия метод за изпитване терминът „изпитван химикал“ се използва за позоваване на онова, което се изпитва, и не е свързан с приложимостта на метода за изпитване ARE-Nrf2 луцифераза за изпитване на вещества и/или смеси. Въз основа на наличните понастоящем данни бе показано, че изследването KeratinoSens™ е приложимо по отношение на изпитвани химикали, които обхващат различни органични функционални групи, механизми за отговор, потенциал за кожна сенсibilизация (както е определена спрочувания *in vivo*) и физични и химични свойства (9) (12) (13) (14). Бяха изпитвани основно вещества с една съставка, макар че съществува ограничен обем данни и за изпитването на смеси (20). Независимо от това методът за изпитване е технически приложим за изпитването на вещества с повече съставки и на смеси. Въпреки това, преди използването на настоящия метод за изпитване по отношение на смес с цел генериране на данни за планирана регулаторна цел, следва да се разгледа въпросът дали той може да даде адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо. Такива съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа. Освен това, когато се извършва изпитване на вещества с повече съставки или на смеси, следва да се обърне внимание на възможното влияние на цитотоксични съставки върху наблюдаваните отклици. Методът за изпитване е приложим за изпитвани химикали, които са разтворими или образуват стабилна дисперсия (т.е. колоиден разтвор или суспензия, в които изпитваният химикал не се утаява или разделя от разтворителя в отделна фаза) или във вода, или в DMSO (включително всички съставки на изпитвания химикал при изпитване на вещество с повече съставки или на смес). Изпитваните химикали, които не отговарят на тези условия при изискваната най-висока крайна концентрация от 2 000 µM (срв. с точка 22), все пак могат да се изпитват при по-ниски концентрации. В такъв случай резултатите, отговарящи на критериите за положителност, посочени в точка 39, могат да продължат да бъдат използвани за подпомагане на идентифицирането на изпитвания химикал като кожен сенсibilизатор, докато получен отрицателен резултат с концентрации < 1 000 µM следва да се смята за недостатъчен за формулиране на заключение (вж. модела на прогнозиране в точка 39). По принцип веществата с LogP до 5 са преминали успешно изпитването, докато силно хидрофобни вещества с LogP над 7 са извън известната приложимост на метода за изпитване (14). За вещества с LogP между 5 и 7 е налична само ограничена информация.

Отрицателните резултати следва да се тълкуват внимателно, тъй като веществата с изключителна реакционна способност спрямо лизинови остатъци могат да бъдат открити като отрицателни от метода за изпитване. Освен това, поради ограничения метаболитен капацитет на използваната клетъчна линия (21) и поради условията на опита, про-хлптените (т.е. химикалите, които изискват ензимно активиране, например чрез P450 ензими) и пре-хлптените (т.е. химикалите, активирани чрез самоокисление), по-специално тези с малка скорост на окисление, могат също да дадат отрицателни резултати. От друга страна изпитвани химикали, които не действат като сенсibilизатор, но които въпреки това са химични стресови фактори, могат да доведат до неверни положителни резултати (14). Освен това, силно цитотоксичните изпитвани химикали не винаги могат да бъдат надеждно оценени. Накрая, изпитвани химикали, които пречат на ензима луцифераза,

▼ M7

могат да доведат до невъзможност за разграничаване на дейността на луциферазата в изследвания, основани на клетки, причинявайки или очевидно потискане, или увеличена луминесценция (22). Например за концентрации на фитоестрогени, по-високи от 1 μM , има данни, че влияят на сигналите за луминесценцията в други изпитвания с репортерни гени, основани на луциферазата, поради свръхактивиране на луциферазния репортерен ген (23). Вследствие на това експресията на луциферазата, получена при високи концентрации на фитоестрогени или подобни химикали, за които се подозира, че предизвикват подобно на фитоестрогени свръхактивиране на луциферазния репортерен ген, трябва да бъде внимателно разгледана (23). В случаите, в които могат да бъдат представени доказателства за неприложимостта на метода за изпитване по отношение на други специфични категории изпитвани химикали, методът за изпитване не следва да се използва за тези специфични категории.

В допълнение към подпомагането на разграничаването на кожни сенсibiliзатори и непредизвикващи сенсibiliзация вещества, изследването KeratinoSens™ също така предоставя информация концентрация-отклик, която потенциално може да допринесе за оценката на потенциала за сенсibiliзация, когато се използва в интегрирани подходи като IATA (19). Изисква се обаче допълнителна работа, за предпочитане въз основа на надеждни данни за хора, за да се определи как резултатите от изследването KeratinoSens™ могат да допринесат за оценка на потенциала (24) и за подкатегоризиране на сенсibiliзаторите в съответствие с GHS на ООН/Регламента CLP.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

В метода за изпитване ARE-Nrf2 луцифераза се използва безсмъртна монослойна клетъчна линия, получена от човешки кератиноцити от HaCaT, стабилно трансфектирана със селективен плазмид. Клетъчната линия съдържа луциферазния ген под контрола под транскрипционния контрол на конститутивен промотор с ARE-елемент от ген, за чиято експресия е известно, че се повишава от контактни сенсibiliзатори (25) (26). Сигналят от луциферазата отразява активиране от сенсibiliзатори на гени, зависими от ендогенен Nrf2, като зависимостта на сигнала от луциферазата от Nrf2 в рекомбинантните клетъчни линии е доказана (27). Това позволява количествено измерване (чрез откриване на луминесценция) на индукция на луциферазния ген, с използване добре познати луциферазни субстрати, излъчващи светлина, като показател за активността на транскрипционния фактор Nrf2 в клетки след експозиция на електрофилни вещества.

Изпитваните химикали се считат за положителни в изследването KeratinoSens™, ако предизвикват статистически значима индукция на луциферазна дейност над определен праг (т.е. > 1,5 пъти или увеличение от 50 %) под определената прагова концентрация, която не оказва значимо влияние върху жизнеспособността на клетките (т.е. под 1 000 μM и при концентрация, при които жизнеспособността на клетките е над 70 % (9) (12)). За тази цел се определя максималната кратност на индукцията на луциферазна активност (I_{max}) по отношение на контролата на разтворител (отрицателната контрола). Освен това, тъй като клетките се експонират на поредица от концентрации на изпитваните химикали, концентрацията, необходима за статистически значима индукция на луциферазна активност над прага (т.е. стойността $EC_{1,5}$) следва да се определи чрез интерполация от кривата доза-отклик (вж. точка 32 за изчисленията). На последно място, следва да се извършат паралелни измервания на цитотоксичността, за да се прецени дали равнищата на индукция на луциферазна активност се получават при субцитотоксични концентрации.

Преди рутинното използване на изследването ARE-Nrf2 луцифераза, което се придържа към настоящия метод за изпитване, лабораториите следва да докажат техническата си компетентност, като използват десетте вещества за изпитването за пригодност, изброени в допълнение 2.

На разположение са стандарти за ефективност (CE) (28) за улесняване на валидирането на нови или модифицирани *in vitro* методи за изпитване ARE-Nrf2 луцифераза, подобни на изследването KeratinoSens™, и за даване на възможност за съвременно изменение на настоящия метод за изпитване с оглед на тяхното включване. Взаимното приемане на данните (MAD) според споразумението на ОИСП може да бъде гарантирано единствено за методи за изпитване, валидирани съгласно PS, ако тези методи за изпитване са преразгледани и включени в съответните насоки за изпитване на ОИСП.

▼ **M7****ПРОЦЕДУРА**

Понастоящем единственият метод, обхванат от настоящия метод за изпитване, е научно валидното изследване KeratinoSensTM (9) (12) (13) (14). Стандартните работни процедури (СПП) за изследването KeratinoSensTM са на разположение и трябва да бъдат използвани при прилагане и използване на метода за изпитване в лабораторията (15). Лабораториите, които желаят да прилагат метода за изпитване, могат да получат рекомбинантната клетъчна линия, използвана в изследването KeratinoSensTM, чрез лицензионно споразумение с разработилия метода за изпитване. В следващите точки се предоставя описание на основните компоненти и процедури на метода за изпитване ARE-Nrf2 луцифераза.

Приготвяне на културите от кератиноцити

Следва да се използва трансгенна клетъчна линия, които съдържа стабилна инсерция на луциферазния репортерен ген под контрола на ARE-елемент (например клетъчна линия KeratinoSensTM). След получаване клетките се размножават (напр. 2 до 4 пасажа) и се съхраняват замразени като хомогенни изходни култури. Клетки от тези първоначални изходни култури могат да се размножават до максимален брой пасажи (т.е. 25 при KeratinoSensTM) и се използват за рутинни изпитвания, като се използва подходящата среда за поддържане (при KeratinoSensTM това са серум, съдържащ DMEM, и генитин).

За изпитването клетките трябва да са достигнали 80-90 % сливане, и следва да се положат грижи, за да се гарантира, че клетките никога не се отглеждат до пълно сливане. Един ден преди изпитването клетките се събират и разпределят в 96-гнездни плаки (10 000 клетки/гнездо при KeratinoSensTM). Следва да се обърне внимание да се избягва утаяване на клетките при посяването, за да се гарантира хомогенно разпределение на броя на клетките между гнездата. Ако случаят не е такъв, тази стъпка може да породи голямо вариране между гнездата. При всяко извършено повтаряне, за измерване на луциферазната активност се използват три повторения и едно паралелно повторение, използвано за изследването на клетъчната жизнеспособност.

Приготвяне на изпитвания химикал и веществата за контроли

Изпитваният химикал и веществата за контроли се приготвят в деня на изпитването. За изследването KeratinoSensTM изпитваните химикали се разтварят в диметилсулфоксид (DMSO) до крайната желана концентрация (напр. 200 mM). Разтворите на DMSO могат да се смятат за самостоятелно стерилизиращи се, поради което не е необходимо стерилно филтруване. Неразтворимият в DMSO изпитван химикал се разтваря в стерилна вода или среда за отглеждане, и разтворите се стерилизират, напр. чрез филтруване. За изпитването на даден химикал, който няма определено молекулно тегло (MW), се приготвя изходен разтвор с концентрация по подразбиране (40 mg/ml или в 4 % (w/v)) в изследването KeratinoSensTM. При разтворители, различни от диметилсулфоксид, вода или среда за отглеждане, следва да се предостави достатъчна научна обосновка.

Въз основа на изходните разтвори на изпитвания химикал в DMSO се приготвят серийни разреждания с DMSO до получаване на 12 концентрации за разреждане на химикала за изпитване (от 0,098 до 200 mM в изследването KeratinoSensTM). За изпитван химикал, неразтворим в DMSO, разрежданията за получаване на концентрациите за разреждане се извършват с помощта на стерилна вода или на стерилна среда за отглеждане. Независимо от използвания разтворител, по-нататък концентрациите за разреждане се разреждат 25-кратно в среда за отглеждане, съдържаща серум, и накрая се използват за третиране с допълнително 4-кратно разреждане, така че крайните концентрации на изпитвания химикал да са в обхват от 0,98 до 2 000 µM в изследването KeratinoSensTM. Алтернативни концентрации могат да бъдат използвани при наличие на обосновка (напр. в случай на цитотоксичност или малка разтворимост).

Отрицателната контрола (на разтворител), използвана в изследването KeratinoSensTM, е DMSO (CAS No. 67-68-5, ≥ 99 % чистота), за която се приготвят шест гнезда на плака. Тя преминава през същото разреждане, както е описано в точка 22 за концентрациите за разреждане, така че окончателната концентрация на отрицателната контрола (на разтворител) да е 1 %, за която е известно, че не оказва влияние върху жизнеспособността на клетките и съответства на същата концентрация на DMSO, каквато е при изпитвания химикал и положителната контрола. За изпитван химикал,

▼ M7

нерастворим в DMSO, разрежданията за който са направени във вода, равнището на DMSO във всички гнезда на крайния разтвор за изпитване трябва да се коригира на 1 %, както и за другите изпитвани химикали и вещества за контроли.

Положителната контрола, използвана при изследването KeratinoSensTM, е канелен алдехид (CAS No. 14371-10-9, $\geq 98\%$ чистота), за който се приготвя поредица от 5 концентрации за разреждане в обхват от 0,4 до 6,4 mM в DMSO (от 6,4 mM изходен разтвор) и се разрежда, както е описано за концентрациите за разреждане в точна 22, така че крайната концентрация на положителната контрола да е в обхват от 4 до 64 μ M. Може да се използват други подходящи положителни контроли, за предпочитане генериращи EC_{1,5} стойности в средата на обхвата, ако има налични данни за предходни периоди за получаване на сравними критерии за приемливост на серията.

Прилагане на изпитвания химикал и веществата за контроли

За всеки изпитван химикал и вещество за положителна контрола е необходим един опит за извеждане на прогноза (положителна или отрицателна), състоящ се от най-малко две независимо извършени повтаряния, всяко от които съдържа по три повторения (т.е. $n=6$). В случай на наличие на несъответстващи резултати между двете независимо извършени повтаряния, следва да се извърши трето повтаряне, съдържащо три повторения (т.е. $n = 9$). Всяко независимо извършено повтаряне се извършва в различен ден с пресен изходен разтвор на изпитваните химикали и независимо събрани клетки. Клетките обаче могат да произхождат от един и същ пасаж.

След посяване, както е описано в точка 20, клетките се отглеждат в продължение на 24 часа в 96-гнездните микротитърни плаки. След това средата се отстранява и се заменя с прясна среда за отглеждане (150 μ l среда за отглеждане, съдържаща серум, но без генетицин KeratinoSensTM), към която се добавят 50 μ l от 25-кратно разреден изпитван химикал и вещества за контроли. Поне едно гнездо от плака следва да бъде оставено празно (без клетки и без третиране), за да се оценят фоновите стойности.

След това третираните плаки се инкубират за около 48 часа при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в присъствието на 5% CO₂ в изследването KeratinoSensTM. Следва да се вземат мерки за избягване на изпаряването на летливи изпитвани химикали и на кръстосаното замърсяване с изпитвани химикали между гнездата, като напр. плаките се покриват с фолио преди инкубирането с изпитвания химикал.

Измервания на луциферазната активност

Три фактора са от решаващо значение, за да се гарантира подходящи показания за луминесценцията:

- изборът на чувствителен луцинометър,
- използването на формат на плака с достатъчна височина, за да се избегне светлинно кръстосано замърсяване; както и
- използването на луциферазен субстрат, излъчващ достатъчно светлина, за да се гарантира достатъчна чувствителност и слабо вариране.

Преди изпитването трябва да се извърши контролен опит по план, описан в допълнение 3, за да се гарантира, че тези три точки са изпълнени.

След 48-часова експозиция с изпитвания химикал и веществата за контроли при изпитването KeratinoSensTM, клетките се измиват с фосфатно буферизиран физиологичен разтвор, и към всяко гнездо се добавя съответният лизиращ буфер за показанията за луминесценцията за 20 минути при стайна температура.

▼ **M7**

След това плаки с клетъчния лизат се слагат в луцинометъра за отчитане на стойностите, което при изпитването KeratinoSens™ е програмирано: i) да се добави луциферазен субстрат към всяко гнездо на (т.е. 50 µl), ii) да се изчака 1 секунда, и iii) да се интегрира луциферазната активност в продължение на 2 секунди. В случай че се използват алтернативни настройки, напр. в зависимост от модела на използвания луцинометър, те трябва да бъдат обосновани. Освен това също може да бъде използван субстрат, излъчващ светлина, при условие, че опитът за контрол на качеството от допълнение 3 е проведен успешно.

Оценка на цитотоксичността

При изследването KeratinoSens™ за жизнеспособността на клетките средата се заменя след 48-часовата време на експозиция с прясна среда, която съдържа МТТ [3-(4,5-диметилтиазол- 2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид, тиазолил син тетразолиев бромид; CAS № 298-93-1) и клетките се инкубират в продължение на 4 часа при 37°C в присъствието на 5 % CO₂. След това средата с МТТ се отстранява и клетките се лизират (напр. чрез добавяне към всяко гнездо на 10 % разтвор на SDS) в продължение на една нощ. След разклащане абсорбцията се измерва при 600 nm с фото-метър.

ДАНИИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Оценка на данните**

Следните параметри се изчисляват в изследването KeratinoSens™:

- максималната средна стойност на кратността на индукцията на луциферазна активност (I_{\max}), наблюдавана при която и да е концентрация на изпитвания химикал и положителната контрола;
- получена е стойността на EC_{1,5}, представляваща концентрацията, при която индукцията на луциферазна активност е над прага от 1,5 пъти (т.е. 50 % увеличение на луциферазната активност); както и
- стойностите на концентрацията IC₅₀ and IC₃₀ за 50 % и 30 % намаляване на клетъчната жизнеспособност.
- Кратността на индукцията на луциферазна активност се изчислява по формула 1, а общата максимална кратност на индукцията (I_{\max}) се изчислява като средната стойност на отделно извършените повтаряния.

Уравнение 1:

$$\text{Кратност на индукция} = \frac{(L_{\text{проба}} - L_{\text{празна проба}})}{(L_{\text{разтворител}} - L_{\text{празна проба}})}$$

където

$L_{\text{проба}}$ е отчетената стойност за луминесценцията в гнездото с изпитвания химикал

$L_{\text{празна проба}}$ е отчетената стойност за луминесценцията в гнездото с празната проба, без клетки и без третиране

$L_{\text{разтворител}}$ е отчетената средна стойност за луминесценцията в гнездата, съдържащи клетки и контрола (отрицателна) на разтворител

EC_{1,5} се изчислява чрез линейна интерполация в съответствие с формула 2, а общата EC_{1,5} се изчислява като средно геометрично на отделно извършените повтаряния.

Уравнение 2:

$$EC_{1,5} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1,5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

▼ M7

където

C_a е най-ниската концентрация в μM с индукция $> 1,5$ пъти

C_b е най-високата концентрация в μM с индукция $< 1,5$ пъти

I_a е кратността на индукцията, измерена при най-ниската концентрация с индукция $> 1,5$ пъти (средна стойност от три гнезда с повторения)

I_b е кратността на индукцията, измерена при най-високата концентрация в с индукция $< 1,5$ пъти (средна стойност от три гнезда с повторения)

Жизнеспособността се изчислява по уравнение 3:

Уравнение 3:

$$\text{Жизнеспособност} = \frac{(V_{\text{проба}} - V_{\text{празна проба}})}{V_{\text{разтворител}} - V_{\text{празна проба}}} \times 100$$

където

$V_{\text{проба}}$ е отчетената стойност на абсорбцията на МТТ в гнездото с изпитвания химикал

$V_{\text{празна проба}}$ е отчетената стойност на абсорбцията на МТТ в гнездото с празната проба, без клетки и без третиране

$V_{\text{разтворител}}$ е отчетената средна стойност на абсорбцията на МТТ в гнездата, съдържащи клетки и контрола (отрицателна) на разтворител

IC_{50} и IC_{30} се изчисляват чрез линейна интерполация в съответствие с формула 4, а общите IC_{50} и IC_{30} се изчисляват като средно геометрично на отделно извършените повтарения.

Уравнение 4:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

където

X е процентното намаление на концентрацията, което трябва да бъде изчислено (50 и 30 за IC_{50} и IC_{30})

C_a е най-ниската концентрация в μM с $> x$ % намаление на жизнеспособността

C_b е най-високата концентрация в μM с $< x$ % намаление на жизнеспособността

V_a е процентът жизнеспособност при най-ниската концентрация в с $> x$ % намаление на жизнеспособността

V_b е процентът жизнеспособност при най-високата концентрация в с $< x$ % намаление на жизнеспособността

За всяка концентрация, показваща $> 1,5$ кратна индукция на луциферазна активност, се изчислява статистическата значимост (напр. чрез двустранен t -тест на Стюдънт), чрез сравняване на стойностите на луминесценцията за трите повторения със стойностите на луминесценцията в гнездата с контролата (отрицателна) на разтворител, за да се определи дали индукцията на луциферазна активност е статистически значима ($p < 0,05$). Най-ниската концентрация с $> 1,5$ кратна индукция на луциферазна активност е стойността, определяща стойността на $EC_{1,5}$. Във всеки отделен случай се проверява дали тази стойност е под стойността на IC_{30} , което показва, че има по-малко от 30 % намаление на клетъчната жизнеспособност при концентрацията, определяща $EC_{1,5}$.

▼ **M7**

Препоръчва се данните да се проверяват визуално с помощта на графики. Ако не се наблюдава ясна крива доза-отклик, или ако получената крива доза-отклик е двуфазна (т.е. преминава два пъти през прага от 1,5), следва да се извърши повтаряне на опита, за да се провери дали това е специфично за изпитвания химикал, или се дължи на артефакт от опита. В случай че двуфазният отклик е възпроизводим в независим опит, следва да бъде отчетена долната стойност на $EC_{1,5}$ (концентрацията, при която прагът от 1,5 е преминал за първи път).

В редките случаи, когато се наблюдава индукция над 1,5 пъти, която не е статистически значима, последвана от по-висока концентрация със статистически значима индукция, резултатите от това извършено повтаряне се смятат за валидни и положителни само ако статистически значимата индукция над прага от 1,5 е била получена при концентрация, която не е цитотоксична.

И накрая, за изпитвани химикали, водещи до 1,5 кратна или по-голяма индукция още при най-ниската изпитвана концентрация от 0,98 μM , стойността на $EC_{1,5} < 0.98$ се определя въз основа на визуалната проверка на кривата доза-отклик.

Критерии за приемливост

Когато се използва изследване KeratinoSensTM трябва да се спазват следните критерии. Първо, индукцията на луциферазна активност, получена при положителната контрола, канелен алдехид, следва да бъде статистически значима над прага от 1,5 (например чрез използване на Т-тест) при най-малко една от изпитаните концентрации (от 4 до 64 μM).

Второ, стойността на $EC_{1,5}$ трябва да бъде в рамките на две стандартни отклонения от средната стойност за изпитващата лаборатория за предходни периоди (напр. между 7 μM и 30 μM въз основа на набора от данни от валидирането), която следва да се актуализира редовно. Освен това средната индукция в трите повторения за канелен алдехид при 64 μM следва да бъде между 2 и 8. Ако последният критерий не е изпълнен, зависимостта доза-отклик за канеления алдехид следва да бъде проверена внимателно и изпитванията могат да бъдат приети само ако е налице ясна зависимост доза-отклик, с увеличаваща се индукция на луциферазна активност при нарастване на концентрациите на положителната контрола.

Накрая, средният коефициент на вариация при отчетената стойност на луминесценцията за отрицателната контрола (на разтворител) DMSO следва да бъде под 20 % при всяко извършено повтаряне, което се състои от 6 гнезда, изпитвани в три повторения. Ако варирането е по-голямо, резултатите следва да бъдат отхвърлени.

Тълкуване на резултатите и модел за прогнозиране

Прогнозата по KeratinoSensTM се счита за положителна, ако всички от посочените по-долу 4 условия са изпълнени във всичките 2 от 2 извършени повтаряния, или в същите 2 от 3 извършени повтаряния, в противен случай прогнозата по KeratinoSensTM се счита за отрицателна (фигура 1):

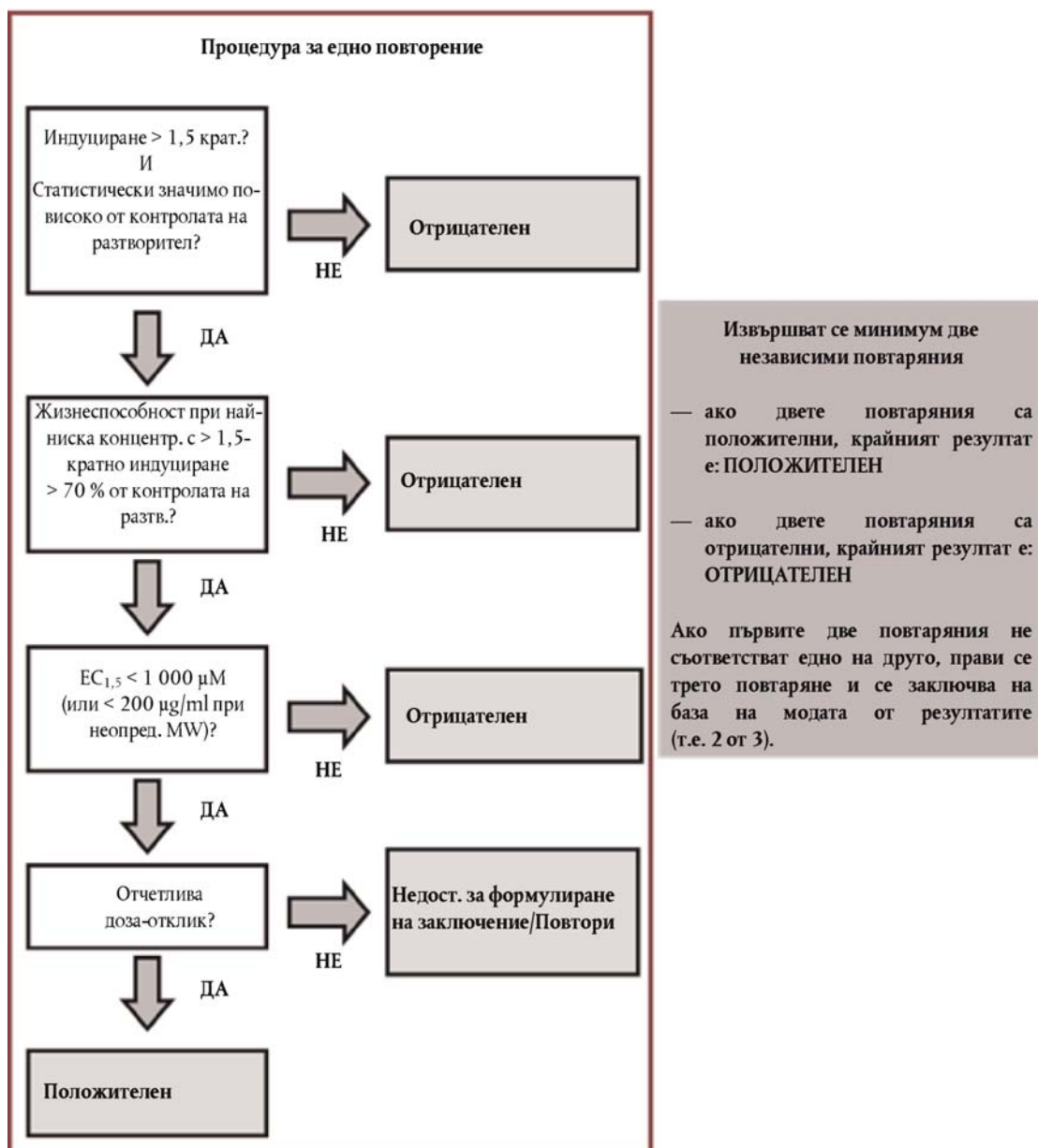
1. I_{max} е по-голяма (>) от 1,5 пъти и разликата спрямо контролата (отрицателна) на разтворител е статистически значима (определена с двустранен t-тест на Стюдънт за несдвоени разлики);
2. Клетъчната жизнеспособност е по-голяма (>) от 70 % при най-ниската концентрация с индукция на луциферазна активност над 1,5 пъти (т.е. при концентрацията, определяща $EC_{1,5}$);
3. Стойността на $EC_{1,5}$ е по-малка от (<) 1 000 μM (или < 200 $\mu\text{g/ml}$ за изпитвани химикали без определено MW);
4. има видима зависимост доза-отклик за луциферазната индукция (или двуфазен отклик, както е посочено в точка 33).

▼ **M7**

Ако в дадено извършено повтаряне са изпълнени всички от първите три условия, но не може да бъде наблюдавана ясна зависимост доза-отклик за луциферазната индукция, тогава резултатът от това извършено повтаряне следва да се счита за недостатъчен за формулиране на заключение и може да бъде необходимо допълнително изпитване (фигура 1). Освен това, отрицателният резултат, получен с концентрации $< 1\,000\ \mu\text{M}$ (или $< 200\ \mu\text{g/ml}$ за изпитвани химикали без определено MW), следва също да се разглежда като недостатъчен за формулиране на заключение (вж. точка 11).

Фигура 1

Модел на прогнозиране, използвани в изследването KeratinoSens™. Прогнозирането по KeratinoSens™ следва да се разглежда в рамките на IATA и в съответствие с разпоредбите на точки 9 и 11.



В редки случаи изпитваните химикали, които индуцират луциферазна активност при равнища, които са много близки до цитотоксичните, могат да бъдат положителни в някои извършени повтаряния при нетоксични равнища (т.е. $EC_{1,5}$, определяща концентрация под ($<$) IC_{30}), а в други извършени повтаряния — само при цитотоксични равнища (т.е. $EC_{1,5}$, определяща концентрация над ($>$) IC_{30}). Такива изпитвани химикали се

▼ **M7**

изпитват отново с по-стеснен анализ доза-отклик, с използване на по-малък коефициент на разреждане (напр. 1,33 или $\sqrt{2}$ (= 1,41) кратно разреждане между гнездата), за да се определи дали индукцията е получена при цитотоксични нива, или не (9).

Протокол от изпитването

Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал

- Вещество с една съставка
 - Химична идентификация, като наименование(я) по IUPAC или по CAS, CAS номер(а), SMILES или InChI код, структурна формула, и/или други идентификатори;
 - Външен вид, разтворимост във вода, разтворимост в DMSO, молекулно тегло и допълнителни относими физични и химични свойства, според наличността;
 - Чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и т.н.;
 - Обработка преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
 - Изпитвана концентрация (концентрации);
 - Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични.
- Вещество с повече съставки, UVCB и смес:
 - характеризиране, доколкото е възможно, чрез химическата идентичност (вж. по-горе), чистотата, количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките (вж. по-горе), доколкото са налични.
 - Външен вид, разтворимост във вода, разтворимост в DMSO и допълнителни относими физични и химични свойства, според наличността;
 - Молекулно тегло или привидно молекулно тегло в случай на смеси/полимери с известен състав или друга информация, относима към провеждането на изследването;
 - Обработка преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
 - Изпитвана концентрация (концентрации);
 - Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични.

Контроли

- Положителна контрола:
 - Химична идентификация, като наименование(я) по IUPAC или по CAS, CAS номер(а), SMILES или InChI код, структурна формула, и/или други идентификатори;
 - Външен вид, разтворимост във вода, разтворимост в DMSO, молекулно тегло и допълнителни относими физични и химични свойства, според наличността, където е приложимо;
 - Чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и т.н.;
 - Обработка преди изпитването, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);
 - Изпитвана концентрация (концентрации);
 - Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични;

▼ M7

- Препратка към резултатите за положителните контроли за предходни периоди, доказващи подходящи критерии за приемливост на серията, ако е приложимо.
- Отрицателно контрола (носител)
 - Химична идентификация, като наименование(я) по IUPAC или по CAS, CAS номер(а) и/или други идентификатори;
 - Чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и т.н.;
 - Външен вид, молекулно тегло и допълнителни относими физични и химични свойства в случай че са използвани отрицателни контроли/ носители, различни от упоменатите в настоящия метод за изпитване и в зависимост от наличността;
 - Условия на съхранение и стабилност, доколкото са налични;
 - Обосновка за избора на разтворител за всеки изпитван химикал.

Условия на метода за изпитване

- Име и адрес на финансиращия, на изпитващата лаборатория и на ръководителя на изследването;
- Описание на използвания метод за изпитване;
- Използвана клетъчна линия, условия за нейното съхранение и източник (например мястото, от което са взети);
- Брой пасажи и равнище на сливане на клетките, използвани за изпитването;
- Метод на преброяване на клетките, използван за посяване преди изпитването, и мерки, предприети за гарантиране на хомогенно разпределение на броя на клетките (вж. точка 20);
- използван луцинометър (напр. модел), включително настройки, използван луциферазен субстрат, и доказване на съответни измервания на луминесценцията въз основа на контролното изпитване, описано в допълнение 3;
- Процедурата, използвана за доказване на пригодността на лабораторията за извършване на метода за изпитване (например чрез изпитване на вещества за изпитването за пригодност), или за доказване на възпроизводимостта на характеристиките на метода за изпитване във времето.

Процедура за изпитване

- Брой на извършените повтаряния и използвани повторения;
- Концентрации на изпитвания химикал, процедура за прилагане и продължителност на експозицията (ако е различно от препоръчаното)
- Описание на използваните критерии за оценка и за решение;
- Описание на използваните критерии за приемливост на изследването.
- Описание на всякакви изменения на процедурата за изпитване.

Резултати

- Представяне в табличен вид на I_{max} , $EC_{1,5}$ и стойностите за жизнеспособността (т.е. IC_{50} , IC_{30}), получени за изпитвания химикал и за положителната контрола за всяко извършено повтаряне, както и средните стойности (I_{max} : средна стойност; $EC_{1,5}$ и стойностите за жизнеспособността: средно геометрично) и SD , изчислени с използване на данните от всички отделно извършени повтаряния, и посочване на ранга на изпитвания химикал в съответствие с модела за прогнозиране;

▼ M7

- Коефициент на вариация, получен за отчетените стойности за луминесценцията в отрицателната контрола за всеки опит;
- Графика, показваща кривите доза-отклик за индукцията на луциферазна активност и за жизнеспособността;
- Описание на всякакви други относими наблюдения, ако е приложимо.

Обсъждане на резултатите

- Обсъждане на резултатите, получени с изследването KeratinoSens™;
- Разглеждане на резултатите от метода за изпитване в рамките на контекста на IATA, ако е налична друга относима информация.

Заключение

ЛИТЕРАТУРА

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. На разположение на адрес: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.
- (3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367-485.
- (4) Глава Б.42 от настоящото приложение: Кожна сенсibilизация: изследване на локалните лимфни възли.
- (5) Глава Б.6 от настоящото приложение: Кожна сенсibilизация.
- (6) Глава Б.50 от настоящото приложение: Кожна сенсibilизация: изследване на локалните лимфни възли: DA.
- (7) Глава Б.51 от настоящото приложение: Кожна сенсibilизация: изследване на локалните лимфни възли: BrdU-ELISA.
- (8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.
- (9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281-290.
- (10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779-1791.

▼ M7

- (11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1(1), 45-49.
- (12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.
- (13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 1337-1352.
- (14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. На разположение на адрес: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.
- (15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17 pp. Available: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>
- (16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol. Sci.* 107, 106-121.
- (17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 60, 389-400.
- (18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 489-504.
- (19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J Appl Toxicol.* 33, 1353-1364.
- (20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. *Toxicology In Vitro* 27, 1220-1225.
- (21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1969.
- (22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology* 17, 646-657.
- (23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
- (25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J. Invest. Dermatol.*, 126, 1813-1822.

▼ M7

- (26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301-316.
- (27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol. in vitro* 27, 2225-2232.
- (28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N0 213, OECD, Paris.
- (29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.
- (30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides — (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. <http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf>

▼ M7

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: степента на близост между резултатите от метода за изпитване и приетите референтни стойности. Това е мярка за характеристиките на метода за изпитване и аспект на „относимостта“. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съответствие“, за да се обозначи относителният дял на правилните резултати при даден метод за изпитване (29).

АОР (път, водещ до неблагоприятен ефект): Последователност от събития от химичната структура на целеви химикал или група от сходни химикали през молекулярното инициращо събитие до представляващ интерес *in vivo* резултат (2).

ARE: елемент, активиращ се в отговор на антиоксидантно въздействие (наричан също EpRE, елемент, активиращ се в отговор на електрофилно въздействие), е елемент, активиращ се в отговор на въздействие, разположен в участъка на промотор, предшествващ останалите участъци в посоката на транскрипцията, в множество цитопротективни гени и гени от фаза II. Когато се активира чрез Nrf2, той е посредник при транскрипционната индукция на тези гени.

Химикал: Вещество или смес.

Коефициент на вариация: Мярка за варирането, която се изчислява за група от данни от повторения като се раздели стандартното отклонение на средната стойност. Той може да бъде умножен по 100 за изразяване в проценти.

ЕС_{1,5}: Интерполирана концентрация за 1,5 кратна луциферазна индукция.

IC₃₀: Концентрация, предизвикваща намаляване на клетъчната жизнеспособност с 30 %.

IC₅₀: Концентрация, предизвикваща намаляване на клетъчната жизнеспособност с 50 %.

Опасност: Вътрешно присъщо свойство на даден агент или ситуация, притежаващо потенциал да предизвика неблагоприятни ефекти когато един организъм, система или (суб-)популация бъдат експонирани на този агент.

IATA (интегриран подход за изпитване и оценка): Структуриран подход, използван за идентифициране на опасност (потенциал), характеризирани на опасност (потенциал) и/или оценка на безопасността (потенциал и експозиция) на даден химикал или група от химикали, който стратегически интегрира и претегля всички данни, относими към предоставянето на информация за вземането на регулаторно решение по отношение на потенциалната опасност и/или риска, и/или необходимостта от допълнително целенасочено и следователно минимално изпитване.

I_{max}: максималната кратност на индукцията на луциферазна активност (I_{max}) по отношение на контролата на разтворител (отрицателната контрола), измерена при която и да е концентрация на изпитван химикал

Keap1: Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein) представлява рецепторен белтък, който може да регулира активността на Nrf2. В отсъствие на индукция рецепторният белтък Keap1 се насочва към транскрипционния фактор Nrf2, с оглед убиквитиниране и протеолитично разграждане в протеазомата. Ковалентно изменение на реактивните цистеинови остатъци на Keap1 от малки молекули може да доведе до дисоциация на Nrf2 от Keap1 (8) (10) (11).

Смес: Смес или разтвор, съставена (съставен) от две или повече вещества, в която (който) те не си взаимодействат (1).

▼ M7

Вещество с една съставка: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който съдържанието на една основна съставка е най-малко 80 % (w/w).

Вещество с повече съставки: Вещество, определено от неговия количествен състав, в който повече от една основна съставка се съдържа в концентрация $\geq 10\%$ (w/w) и $< 80\%$ (w/w). Веществото с повече съставки е резултат от производствен процес. Разликата между смес и вещество с повече съставки е, че дадена смес е получена чрез смесване на две или повече вещества без химична реакция. Веществото с повече съставки е резултат от химична реакция.

Nrf2: Ядреният фактор „(erythroid-derived 2)-like 2“ е транскрипционен фактор, участващ в пътя за антиоксидантен отговор. Когато Nrf2 не е убиквитиниран, той се отделя в цитоплазмата и се транслоцира в ядрото, където се свързва с ARE в участъка на промотора, предшестващ останалите участъци в посоката на транскрипцията в множество цитопротективни гени, като иницира транскрипцията им (8) (10) (11).

Положителна контрола: Повторение, съдържащо всички компоненти на дадена изпитвана система и третирано с вещество, за което е известно, че предизвиква положителен отклик. За да гарантира, че може да се направи оценка на варирането на отклика в положителната контрола във времето, големината на положителния отклик не следва да е прекомерна.

Относителност: описание на взаимовръзката между изпитването и ефекта, представляващ интерес, и дали тя е значима и полезна за определена цел. Това е степента, в която изпитването правилно измерва или прогнозира биологичния ефект, представляващ интерес. Относителността включва разглеждането на точността (съответствието) на метода за изпитване (29).

Надеждност: мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да се приложи възпроизводимо в една и съща лаборатория и в различни лаборатории по различно време, при използване на един и същи протокол. Оценка за нея се прави като се изчислява вътрешнолабораторната и междулабораторната възпроизводимост и вътрешнолабораторната повторяемост (29).

Възпроизводимост: Съгласуваността между резултатите, получени чрез изследване на същия химикал, като се използва същият протокол за изпитване (вж. надеждност) (29).

Чувствителност: Относителният дял на всички положителни/активни химикали, които са класифицирани правилно чрез метода за изпитване. Това е мярка за точността на метода за изпитване, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на относителността на метода за изпитване (29).

Контрол на разтворител/носител: Повторение, съдържащо всички съставки на дадена изпитвана система, с изключение на изпитвания химикал, но с разтворителя, който се използва. Използва се за определяне на базовия отклик на пробите, третирани с изпитвания химикал, разтворен в същия разтворител.

Специфичност: Относителният дял на всички отрицателни/неактивни химикали, които са класифицирани правилно чрез метода за изпитване. Това е мярка за точността на метода за изпитване, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на относителността на метода за изпитване (29).

Вещество: химичен елемент и неговите съединения в естествено състояние или получени чрез всеки производствен процес, включително всяка добавка, необходима за запазване на стабилността на продукта и всеки примес, извлечен от използвания процес, с изключение на всеки разтворител, който може да бъде отделен, без да се засяга стабилността на веществото или да се променя неговият състав (1).

Изпитван химикал: Терминът „изпитван химикал“ се използва за обозначаване на онова, което се изпитва.

▼ M7

Глобална хармонизирана система на Организацията на обединените нации за класифициране и етикетирание на химикали (GHS на ООН): система, предлагаща класифициране на химикали (вещества и смеси) според стандартизирани видове и степени на физическа, здравна и екологична опасност и разглеждаща съответни съобщителни елементи, като например пиктограми, сигнални думи, предупреждения за опасност, препоръки за безопасност и информационни листовки за безопасност, така че те да съобщават информация за тяхното неблагоприятно въздействие с оглед защита на хората (включително работодатели, работещи, служители в транспорта, потребители и аварийни служители) и на околната среда (1).

UVCB: Вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали.

Валиден метод за изпитване: Метод за изпитване, за който се смята, че притежава достатъчна относимост и надеждност по отношение на конкретна цел и който се основава на научно обосновани принципи. Даден метод за изпитване никога не е валиден в абсолютен смисъл, а само по отношение на определена цел (29).

▼ M7

Допълнение 2

ВЕЩЕСТВА ЗА ИЗПИТВАНЕ ЗА ПРИГОДНОСТ

***In vitro* кожна сенсibilизация: Метод за изпитване ARE-Nrf2 луцифераза**

Преди рутинното използване на настоящия метод за изпитване, лабораториите следва да докажат техническата си компетентност, като правилно получат очакваната прогноза по KeratinoSens™ за 10-те вещества за изпитване за пригодност, препоръчани в Таблица 1, и чрез получаване на стойности за EC_{1,5} и IC₅₀, които попадат в съответния референтен обхват за минимум 8 от 10-те вещества за изпитване за пригодност. Тези вещества за изпитване за пригодност са подбрани като представителни за размаха от отклони за опасностите от кожна сенсibilизация. Други критерии за подбор са, че те са налични в търговската мрежа, че са налични висококачествени *in vivo* референтни данни и че са налични висококачествени *in vitro* данни от изследването KeratinoSens™.

Таблица 1

Препоръчвани вещества за доказване на техническа компетентност по отношение на изследването KeratinoSens™

Вещества за изпитване за пригодност	CASRN	Агрегатно състояние	<i>In vivo</i> прогноза (1)	KeratinoSens™ Прогноза (2)	Референтен обхват EC _{1,5} (µM) (3)	Референтен обхват EC ₅₀ (µM) (3)
Изопропанол	67-63-0	Течност	Непредизвикващо сенсibilизация вещество	Отрицателен резултат	> 1 000	> 1 000
Салицилова киселина	69-72-7	Твърдо	Непредизвикващо сенсibilизация вещество	Отрицателен резултат	> 1 000	> 1 000
Млечна киселина	50-21-5	Течност	Непредизвикващо сенсibilизация вещество	Отрицателен резултат	> 1 000	> 1 000
Глицерол	56-81-5	Течност	Непредизвикващо сенсibilизация вещество	Отрицателен резултат	> 1 000	> 1 000
Цинамилов алкохол	104-54-1	Твърдо	Сенсibilизатор (слаб)	Положителен резултат	25 — 175	> 1 000
Етиленгликолдиметакрилат	97-90-5	Течност	Сенсibilизатор (слаб)	Положителен резултат	5 — 125	> 500
2-Меркаптобензотиазол	149-30-4	Твърдо	Сенсibilизатор (умерен)	Положителен резултат	25 — 250	> 500
Метилдибромоглутаронитрил	35691-65-7	Твърдо	Сенсibilизатор (силен)	Положителен резултат	< 20	20 — 100
4-Метиламинофенолсулфат	55-55-0	Твърдо	Сенсibilизатор (силен)	Положителен резултат	< 12,5	20 — 200
2,4-динитрохлоробензен	97-00-7	Твърдо	Сенсibilизатор (изключително силен)	Положителен резултат	< 12,5	5 — 20

(1) *In vivo* прогнозите за опасност (и потенциал) се основават на данни от LLNA (13). *In vivo* потенциалът е изведен с използване на критериите, предложени от ЕСЕТОС (24).

(2) Прогнозата по KeratinoSens™ следва да се разглежда в рамките на IATA и в съответствие с разпоредбите на точки 9 и 11 от настоящия метод за изпитване.

(3) Въз основа на наблюдавани стойности от предходни периоди (12).

▼M7

Допълнение 3

КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО ПРИ ИЗМЕРВАНИЯТА НА ЛУМИНЕСЦЕНЦИЯТА**Основен опит за осигуряването на оптимални измервания на луминесценцията в изследването KeratinoSens™**

Следните три параметъра са от решаващо значение, за да се гарантира получаването на надеждни резултати с луминометъра:

- наличие на достатъчна чувствителност, даваща стабилен фон в гнездата с контролите;
- отсъствие на градиент в плаката, дължащ се на продължителното време за отчитане на стойностите; както и
- отсъствие на светлинно замърсяване в прилежащите гнезда от гнезда с висока активност.

Преди изпитването се препоръчва да се гарантира наличието на подходящи измервания на луминесценцията чрез изпитване на план с контролна плака, описан по-долу (анализ с три повторения).

План за плака за първия предварителен опит

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	EGDMA 0,98	EGDMA 1,95	EGDMA 3,9	EGDMA 7,8	EGDMA 15,6	EGDMA 31,25	EGDMA 62,5	EGDMA 125	EGDMA 250	EGDMA 500	EGDMA 1000	EGDMA 2000
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	CA 4	CA 8	CA 16	CA 32	CA 64	Празна проба

EGDMA = Етиленгликолдиметакрилат (CAS №: 97-90-5) силно индуциращ химикал

CA = Канелен алдехид, положителна референтна контрола (CAS №: 104-55-2)

Анализът за контрол на качеството следва да докаже:

- ясна зависимост доза-отклик в ред D, с $I_{\max} > 20$ пъти над фона (в повечето случаи се достигат стойности на I_{\max} между 100 и 300);
- отсъствие на зависимост доза-отклик в редове C и E (отсъствие на стойност на индукция над 1,5 (в идеалния случай не трябва да надхвърля 1,3) поради възможното светлинно замърсяване, особено в близост до гнезда с висока активност в реда с EGDMA);
- отсъствие на статистически значима разлика между редовете A, B, C, E, F и G (т.е. отсъствие на градиент в плаката); както и
- варирането във всеки от редовете A, B, C, E, F и G и в гнездата с DMSO в ред H следва да бъде под 20 % (т.е. стабилен фон).

▼ M7**Б.61. МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ С ПРОПУСКАНЕ НА ФЛУОРЕСЦЕН И ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ХИМИКАЛИ С КОРОЗИВНО И СИЛНО ДРАЗНЕЩО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ ОЧИТЕ****ВЪВЕДЕНИЕ**

Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСР (TG) 460 (2012). Методът за изпитване с пропускане на флуоресцен (FL) е *in vitro* метод за изпитване, който може да се използва при определени обстоятелства и със специфични ограничения за класифициране на химикали (вещества и смеси) като химикали с корозивно и силно дразнещо действие върху очите, както са определени в Глобалната хармонизирана система на Организацията на обединените нации (ООН) за класифициране и етикетирание на химикали (GHS) (категория 1), Регламент (ЕО) № 1272/2008 относно класифицирането, етикетиранието и опаковането на вещества и смеси (CLP) ⁽¹⁾ (категория 1) и Агенцията на САЩ за защита на околната среда (ЕРА) (категория I) (1) (2). За целите на настоящия метод за изпитване химикалите със силно дразнещо действие върху очите се определят като химикали, които предизвикват тъканно увреждане на окото след прилагане на изпитван химикал, което не е обратимо в рамките на 21 дни, или които причиняват сериозно физическо влошаване на зрението, а химикалите с корозивно действие върху очите — като химикали, които причиняват необратимо тъканно увреждане на окото. Тези химикали са класифицирани като категория 1 по GHS на ООН, категория 1 по Регламент CLP на ЕС или категория I по ЕРА.

Независимо че методът за изпитване FL не се смята за валиден като пълен заместител на *in vivo* изпитването върху заешки очи, FL се препоръчва за използване като част от стратегия за поетапно изпитване за регулаторно класифициране и етикетирание. По този начин FL се препоръчва като първа стъпка от подход „отгоре надолу“ за идентифициране на химикали с корозивно/силно дразнещо действие върху очите, конкретно по отношение на ограничен брой типове химикали (т.е. разтворими във вода вещества и смеси) (3) (4).

Понастоящем е общоприето, че в обозримо бъдеще, нито едно *in vitro* изпитване за дразнене на очите няма да е в състояние да замести *in vivo* изпитването за действие върху очите (МИ Б.5 (5)) при прогнозирането в целия спектър на дразнене, за различните класове химикали. При все това стратегическите комбинации от няколко алтернативни методи за изпитване в рамките на стратегия за (поетапно) изпитване може да са в състояние да заместят *in vivo* изпитването за действие върху очите (4). Подходът „отгоре надолу“ (4) е създаден да се използва, когато, въз основа на наличната информация, се очаква химикалът да има висок потенциал за дразнещо действие.

Въз основа на модела на прогнозиране, подробно описан в точка 35, методът за изпитване FL може да идентифицира химикали в рамките на ограничена област на приложимост като химикали с корозивно/силно дразнещо действие върху очите (категория 1 по GHS на ООН; категория I по CLP на ЕС; категория I по ЕРА) без по-нататъшно изпитване. Същото се допуска за смесите, въпреки че за валидирането не са използвани смеси. Следователно, методът за изпитване FL може да се използва за определяне на корозивно/силно дразнещо действие върху очите на химикали, като се следва за последователно изпитване от МИ Б.5 (5). Независимо от това, даден химикал, за който с метода за изпитване FL не се прогнозира корозивно или силно дразнещо действие върху очите, трябва да бъде изпитан с един или повече допълнителни методи за изпитване (*in vitro* и/или *in vivo*), които дават възможност за точно определяне на i) химикали, които при FL дават *in vitro* неверни отрицателни резултати за корозивно/силно дразнещо действие върху очите (категория 1 по GHS на ООН; категория I по CLP на ЕС; категория I по ЕРА; ii) химикали, които не са класифицирани за корозивно/дразнещо действие върху очите (без категория по GHS на ООН; „Без категория“ по CLP на ЕС; категория IV

⁽¹⁾ Регламент (ЕО) № 1272/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 г. относно класифицирането, етикетиранието 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).

▼ M7

по ЕРА; и/или iii) химикали, които са с умерено/леко дразнещо действие върху очите (категории 2A и 2B по GHS на ООН; категория 2 по CLP на ЕС; категории II и III по ЕРА;

Целта на настоящия метод за изпитване е да се опишат процедурите, използвани за оценка на потенциалното корозивно или силно дразнещо действие върху очите на изпитван химикал, измерено чрез способността му да предизвиква увреждания на непроницаем конфлуентен епителен монослой. Ненарушеността на трансепителната пропускливост е основна функция на епитела, като този в конюнктивата и роговицата. Трансепителната пропускливост се контролира от различни тесни връзки. Доказано е, че съществува корелация между увеличаването на пропускливостта на епитела на роговицата *in vivo* и нивото на възпаление и повърхностното увреждане, наблюдавано при развитието на дразненето на очите.

При метода за изпитване FL токсичните ефекти след краткосрочна експозиция на изпитвания химикал се измерват чрез увеличаване на пропускливостта по отношение на натриев флуоресцеин през епителния монослой на клетки на Мадин-Дарби от бъбрек на куче (MDCK), отглеждани върху пропускливи вложки. Полученото количество пропуснат флуоресцеин е пропорционално на предизвиканите от химикала увреждания на тесните връзки, дезмосомните връзки и клетъчните мембрани, и може да се използва за оценка на потенциала за токсичност върху очите на даден изпитван химикал. В допълнение 1 е дадена схема на MDCK клетки, отглеждани върху мембрана на вложка за метода за изпитване FL.

Определенията са дадени в допълнение 2.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Настоящият метод за изпитване се основава на протокол № 71 на INVITOX (6), който е бил оценен в международно изследване за валидиране от Европейския център за валидиране на алтернативни методи (ECVAM), в сътрудничество с Междудевомствения координационен комитет на САЩ за валидиране на алтернативни методи (ICCVAM) и Японския център за валидиране на алтернативни методи (JaCVAM).

Методът за изпитване FL не се препоръчва за идентификацията на химикали, които следва да бъдат класифицирани като химикали със слабо/умерено дразнещо действие, или на химикали, които не следва да се класифицират за дразнещо действие върху очите (вещества и смеси) (т.е. категория 2A/2B, „Без категория“ по GHS на ООН; категория 2, „Без категория“ по CLP на ЕС; категории II/III/IV по ЕРА), както е доказано в изследването за валидиране (3) (7).

Методът за изпитване е приложен само при разтворими във вода химикали (вещества и смеси). Потенциалът за силно дразнещо действие върху очите на химикалите, които са разтворими във вода и/или при които токсичният ефект не е засегнат от разреждане, като цяло се прогнозира точно при използване на метода за изпитване FL (7). За категоризирането на химикала като разтворим във вода при опитните условия, той трябва да е разтворим в стерилен балансиран солен разтвор на Ханкс (HBSS), съдържащ калций (с концентрация от 1,0-1,8 mM) и несъдържащ фенолово червено, в концентрация ≥ 250 mg/ml (една доза над граничната стойност от 100 mg/ml). Ако обаче изпитваният химикал е разтворим в концентрация, по-малка от 100 mg/ml, но при тази концентрация вече предизвиква индукция на FL от 20 % (т.е. $FL_{20} < 100$ mg/ml), той все пак може да бъде класифициран като категория 1 на GHS или категория I по ЕРА.

Установените ограничения на настоящия метод за изпитване изключват от областта на приложимост силните киселини и основи, фиксаторите на клетки и силно летливите химикали. Тези химикали са с механизми, които не се измерват по метода за изпитване FL, напр. значителна коагулация, осапуняване или специфични химични реакции. Други установени ограничения на настоящия метод за изпитване се основават на резултатите за прогнозния капацитет за цветни и вискозни изпитвани химикали (7). И за двата типа химикали се предполага, че е трудно да се отстранят от монослоя след краткосрочна експозиция, а също, че предсказуемостта на

▼ M7

метода за изпитване може да се подобри, ако се използват по-голям брой етапи на промиване. Твърдите химикали, суспендирани в течност, имат склонност да се утаяват и крайната концентрация в клетките може да се окаже трудна за определяне. Когато химикалите от тези химични и физични класове бъдат изключени от базата данни, точността на FL навсякъде в системите за класификация на ЕС, ЕРА и GHS значително се подобрява (7).

Предвид целта на настоящия метод за изпитване (т.е. идентифициране само на химикали с корозивно/силно дразнещо действие върху очите) процентите неверни отрицателни резултати (вж. точка 13) не са от решаващо значение, тъй като такива химикали се изпитват впоследствие с други достатъчно валидирани *in vitro* изпитания или при зайци, в зависимост от регулаторните изисквания, като се прилага стратегия за последователно изпитване с подход, основан на тежестта на доказателствата (5) (вж. също точки 3 и 4).

Други установени ограничения на метода за изпитване FL се основават на проценти неверни отрицателни и неверни положителни резултати. Когато се използват като първа стъпка от подход „отгоре надолу“ за идентифициране на разтворими във вода вещества и смеси с корозивно/силно дразнещо действие върху очите (категория 1 по GHS на ООН; категория 1 по CLP на ЕС; категория I по ЕРА на САЩ) процентът неверни положителни резултати за метода за изпитване FL е варирал от 7 % (7/103; GHS на ООН и Регламент CLP на ЕС) до 9 % (9/99; ЕРА на САЩ), неверните отрицателни резултати са варирали от 54 % (15/28; ЕРА на САЩ) до 56 % (27/48; GHS на ООН и Регламент CLP на ЕС) в сравнение с *in vivo* резултатите. Групите химикали, показващи неверни положителни и/или неверни отрицателни резултати в метода за изпитване FL, не са определени тук.

Някои технически ограничения са специфични за клетъчната култура MDCK. Качеството на тесните връзки, които блокират пропускането на багрилото натриев флуоресцеин през монослоя, намалява с увеличаването на броя пасажи на клетките. Непълното образуване на тесните връзки води до повишено FL в нетретирани контроли. Поради това е важно определянето на допустимо максимално пропускане при нетретирани контроли (вж. точка 38: пропускане 0 %). При всички *in vitro* изследвания съществува потенциал клетките да се трансформират във времето, поради което е жизненоважно да се посочат обхватите за броя пасажи при изследванията.

Настоящата област на приложимост може да бъде разширена в някои случаи, но само след анализ на разширен набор от данни за проучени изпитвани химикали, за предпочитане получен чрез изпитване (3). Настоящият метод за изпитване ще бъде актуализиран по съответен начин при вземане под внимание на нова информация и данни.

Всяка лаборатория, която за първи път започва да извършва такива изследвания, следва да използва химикалите за изпитване на пригодност, посочени в допълнение 3. Лабораториите могат да използват тези химикали за доказване на своята техническа компетентност за прилагане на метода за изпитване FL преди предаване на данните от изследването за FL за целите на регулаторното класифициране според степента на опасност.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

Методът за изпитване FL е *in vitro* изследване, основано на цитотоксичността и функционирането на клетката, което се извършва върху конфлуентен монослой от тубуларни епителни клетки MDCK CB997, които се отглеждат върху полупропускливи вложки и служат за модел за *in vivo* епител на роговица в отсъствие на пролиферация. Клетъчната линия MDCK е добре позната и образува тесни връзки и дезмозомни връзки, сходни с установените в апикалната страна на епитела на конюнктивата и на роговицата. Тесните и дезмозомните връзки *in vivo* предотвратяват проникването на разтворени вещества и чужди материали в епитела на роговицата. Загубата на трансепителна пропускливост поради увредени тесни връзки и дезмозомни връзки е една от ранните прояви на предизвикано от химикал дразнене на очите.

▼ **M7**

Изпитваният химикал се прилага към конфлуентния слой от клетки, отглеждан върху апикалната страна на вложката. Обичайно се използва краткосрочна 1-минутна експозиция, за да се отрази нормалната скорост на клирънс при експозиция на човека. Предимство на краткосрочната експозиция е, че веществата и смесите във вода могат да се изпитват в чист вид, ако могат лесно да бъдат отстранени след експозицията. Това дава възможност за по-преки сравнения на резултатите с въздействието на химикала върху човека. След това изпитваният химикал се отстранява и към апикалната страна на монослоя се добавя нетоксичното и силно флуоресциращо багрило натриев флуоресцеин за 30 минути. Уврежданията, причинени от изпитвания химикал на тесните връзки, се определя от количеството флуоресцеин, пропуснато през клетъчния слой в рамките на определен период от време.

Количеството багрило натриев флуоресцеин, което преминава през монослоя и мембраната на вложката в определен обем разтвор, наличен в гнездото (към който се пропуска багрилото натриев флуоресцеин), се определя чрез спектрофлуорометрично измерване на концентрацията на флуоресцеина в гнездото. Количеството пропуснат флуоресцеин (FL) се изчислява спрямо отчетените стойности за интензитета на флуоресценция (FI) от две контроли: контрола с празна проба, и контрола на максимално пропускане. Процентът на пропускането и следователно количеството увреждания на тесните връзки се изразява, спрямо тези контроли, за всяка от определените концентрации на изпитвания химикал. След това се изчислява FL₂₀ (т.е. концентрацията, която причинява 20 % FL спрямо стойността, отчетена за нетретирания конфлуентен монослой и вложките без клетки). Стойността на FL₂₀ (mg/ml) се използва в модела на прогнозиране за идентифициране на химикали с корозивно и силно дразнещо действие върху очите (вж. точка 35).

Възстановяването е важна част от токсичния профил на даден изпитван химикал и то също се оценява чрез *in vivo* изпитването за дразнещо действие върху очите. Предварителни анализи показваха, че данните за възстановяването (до 72 часа след експозиция на химикали) потенциално биха могли да увеличат капацитета за предвиждане на протокол № 71 на INVITOX, но е необходима допълнителна оценка, която може да бъде подпомогната от допълнителни данни, за предпочитане придобити чрез допълнително изпитване (6). Настоящият метод за изпитване ще бъде актуализиран по съответен начин при вземане под внимание на нова информация и данни.

ПРОЦЕДУРА**Приготвяне на клетъчния монослой**

Монослоят от клетки MDCK CB997 се приготвя с отглеждане на субконфлуентни клетки в колби за клетъчни култури в среда DMEM/хранителна смес F12 (1x концентрат с L-глутамин, 15 mM HEPES, калций (с концентрация от 1,0-1,8 mM) и 10 % топлинно инактивиран FCS/FBS). Важно е да се отбележи, че всички среди/разтвори, използвани по време на FL изследването, следва да съдържа калций при концентрация между 1,8 mM (200 mg/l) и 1,0 mM (111 mg/l) за да се гарантират образуването на тесни връзки и целостта. Обхватът на броя пасажи трябва да се контролира, за да се гарантира еднакво и възпроизводимо образуване на тесни връзки. За предпочитане е броят на пасажите на клетките да бъде в рамките на обхват 3-30 след размразяването, тъй като в рамките на този обхват пасажи клетките имат сходни функционални възможности, което допринася за възпроизводимостта на резултатите от изследването.

Преди извършване на метод за изпитване FL клетките се отделят от колбата чрез трипсинизация, центрофугират се и подходящ брой клетки се посява във вложките, поставени в 24-гнездни плаки (вж. допълнение 1). За посяване на клетките следва да се използват вложки с диаметър дванадесет mm с мембрана от смесени целулозни естери, дебелина 80-150 µm и размер на порите 0,45 µm. В изследването за валидиране са били използвани вложки Millicell-NA 12 mm. Свойствата на вложката и типа мембрана са важни, тъй като те могат да повлияят на клетъчния растеж и на свързването на химикала. Някои типове химикали могат да се свързват с мембраната на вложката Millicell-NA, което би могло да засегне тълкуването на резултатите. Химикалите за изпитване на пригодност (вж. допълнение 3) следва да бъдат използвани, за да се докаже еквивалентността, ако са използвани други мембрани.

▼ M7

Химическото свързване към мембраната на вложката е по-често срещано при катионните химикали, като бензалкониевият хлорид, които се привличат от заредената мембрана (7). Химическото свързване към мембраната на вложката може да увеличи времето на експозиция на химикала, което води до надценяване на токсичния потенциал на химикала, но може също и физически да намали проникването на флуоресцеин през вложката чрез свързване на багрилото към катионния химикал, свързан към мембраната на вложката, което води до подценяване на токсичния потенциал на химикала. Това може лесно да се наблюдава чрез експозиция само на мембраната на най-високата концентрация на изпитвания химикал и последващо добавяне на багрило натриев флуоресцеин при нормалната концентрация за стандартното време (без клетъчни контроли). Ако се получи свързване на багрилото натриев флуоресцеин, мембраната на вложката изглежда оцветена в жълто след промиването на изпитвания материал. В този контекст е от значение да се познаят свойствата на свързване на изпитвания химикал, за да може да бъде тълкувано въздействието на химикалите върху клетките.

Посяването на клетките върху вложките следва да доведе до получаването на конфлуентен монослой в момента на експозицията на химикала. На вложка следва да бъдат добавени $1,6 \times 10^5$ клетки ($400 \mu\text{l}$ от клетъчна суспензия с плътност 4×10^5 клетки/ml). При тези условия конфлуентен монослой се получава обикновено след 96 часа отглеждане в култура. Вложките следва да бъдат разгледани визуално преди посяване, така че да се гарантира, че всяко увреждане, отчетено с визуалния контрол, описан в точка 30, се дължи на боравенето.

Клетъчните култури MDCK следва да се съхраняват в инкубатори във влажна атмосфера при $5\% \pm 1\% \text{ CO}_2$ и $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Клетките следва да не са заразени с бактерии, вируси, микоплазма и гъбички.

Прилагане на изпитваните и контролните химикали

За всяка опитна серия трябва да се приготви пресен изходен разтвор, който да се използва в рамките на 30 минути от приготвянето. Изпитваните химикали следва да бъдат приготвени в HBSS, съдържащ калций (с концентрация от 1,0-1,8 mM) и несъдържащ фенолово червено, за да се избегне свързване със серумен белтък. Разтворимостта на химикала при 250 mg/ml в HBSS следва да се оцени преди изпитването. Ако при тази концентрация химикалът образува стабилна суспензия или емулсия (т.е. не се променя и не се утаява или разделя в повече от една фаза) за над 30 минути, HBSS все още може да се използва като разтворител. Независимо от това, ако за химикала е установено, че е неразтворим в HBSS при тази концентрация, трябва да бъде взето под внимание използването на други методи за изпитване вместо FL. Използването на леко минерално масло като разтворител в случаите, когато е установено, че химикалът е неразтворим в HBSS, следва да се разглежда предпазливо, тъй като няма достатъчно налични данни, за да се направи заключение относно характеристиките на FL изследването при такива условия.

Всички химикали, които ще бъдат изпитвани, се приготвят в стерилен HBSS, съдържащ калций (с концентрация от 1,0-1,8 mM) и несъдържащ фенолово червено, от изходния разтвор, в пет разреждания с фиксирани масови концентрации: 1, 25, 100, 250 mg/ml, както и чист или наситен разтвор. При изпитване на твърди химикали следва да бъде включена много висока концентрация от 750 mg/ml. Тази концентрация на химикала може да трябва да се прилага върху клетките с използване на пипета с позитивно изтласкване. Ако е констатирана токсичност между 25 и 100 mg/ml, следните допълнителни концентрации следва да бъдат изпитани два пъти: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. Стойността на FL₂₀ следва да бъде получена от тези концентрации, при условие че са изпълнени критериите за приемливост.

Изпитваните химикали се прилагат към конфлуентните клетъчни монослоеве след отстраняване на средата за отглеждане на клетки и измиване два пъти със стерилен топъл ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) HBSS, съдържащ калций (с концентрация от 1,0-1,8 mM) и несъдържащ фенолово червено. Преди това филтрите се проверяват визуално за съществуващи увреждания, които биха могли да бъдат невярно приписани на потенциални несъвместимости с изпитвани химикали. Във всяка серия трябва да се използват най-малко

▼ **M7**

по три повторения за всяка концентрация на изпитвания химикал и за контролите. След 1 минута експозиция при стайна температура, изпитваният химикал следва да се отстранява внимателно чрез засмукване, монослоят трябва да се промие два пъти със стерилен топъл (37 °C) HBSS, съдържащ калций (с концентрация от 1,0-1,8 mM) и несъдържащ фенолово червено, и пропускането на флуоресцеин следва да бъде измерено незабавно.

Във всяка серия трябва да се използват паралелни отрицателни (OK) и положителни контроли (ПК), за да се докаже, че целостта на монослоя (OK) и чувствителността на клетките са в границите на определен предходно установен интервал на приемливост. Предложеният химикал за ПК е Brij 35 (CAS № 9002-92-0) при 100 mg/ml. Тази концентрация следва да дава приблизително 30 % пропускане на флуоресцеин (приемлив обхват 20-40 % пропускане на флуоресцеин, т.е. увреждане на клетъчния слой). Предложеният химикал за OK е HBSS, съдържащ калций (с концентрация от 1,0-1,8 mM) и несъдържащ фенолово червено (нетретирана, празна контрола). Също така, във всяка серия следва да бъде включена контрола на максимално пропускане, за да се даде възможност за изчисляване на стойностите на FL₂₀. Максималното пропускане се определя с използване на контролна вложка без клетки.

Определяне на пропускливостта на флуоресцеин

Незабавно след отстраняването на изпитваните и контролните химикали, към вложките (напр. Millicell-HA) се добавят 400 µl от 0,1 mg/ml разтвор на натриев флуоресцеин (0,01 % (w/v) в HBSS, съдържащ калций (с концентрация от 1,0-1,8 mM) и несъдържащ фенолово червено. Културите се съхраняват в продължение на 30 минути при стайна температура. В края на инкубирането с флуоресцеин вложките внимателно се отстраняват от всяко гнездо. Извършва се визуална проверка на всеки филтър и всяко увреждане, което може да се е получило при боравенето, се записва.

Флуоресцеинът, пропуснат през монослоя и вложката, се определя количествено в разтвора, останал в гнездата, след отстраняване на вложките. Измерванията се извършват в спектрофлуорометър при дължини на вълната на възбуждане и емисия съответно 485 nm и 530 nm. Чувствителността на спектрофлуорометъра се настройва така, че да има най-голяма числова разлика между максималното FL (вложка без клетки) и минималното FL (вложка с конфлуентен монослой, третирана с OK). Поради разликите в използвания спектрофлуорометър се предлага да се използва чувствителност, което ще даде на интензитет на флуоресценцията > 4 000 при контролата на максимално пропускане на флуоресцеин. Стойността на максималното FL не трябва да бъде по-голяма от 9 999. Интензитетът на флуоресценцията при максимално пропускане следва да попадне в рамките на линейния обхват на използвания спектрофлуорометър.

Тълкуване на резултатите и модел за прогнозиране

Количеството FL е пропорционално на предизвиканите от химикала увреждания на тесните връзки. Процентът на FL за всяка изпитвана концентрация на химикал се изчислява въз основа на стойностите за FL, получени за изпитвания химикал, спрямо стойностите за FL от OK (отчетена стойност от конфлуентния клетъчен монослой, третиран с OK) и контролата на максимално пропускане (отчетена стойност за количеството FL през вложка без клетки).

Средният интензитет на флуоресценцията при максимално пропускане = x

Средният интензитет на флуоресценцията при 0 % пропускане (OK) = y

Средното 100 % пропускане се получава чрез изваждане на средното 0 % пропускане от средното максимално пропускане,

т.е. $x - y = z$

Процентът на пропускане за всяка фиксирана доза се получава чрез изваждане на 0 %-ото пропускане от средната стойност на интензитета на флуоресценцията от отчетените стойности за трите повторения (m), и разделяне на тази стойност на 100 %-ото пропускане, т.е. $\% FL = [(m - y) / z] \times 100 \%$, където:

▼M7

M = средната стойност на интензитета на флуоресценцията от измерените стойности за трите повторения за съответната концентрация

% FL = процентът на флуоресцеина, пропуснат през клетъчния слой

Следва да се приложи следното уравнение за изчисляване на концентрацията на химикала, водеща до 20 % FL:

$$FL_D = [(A - B) / (C - B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

където:

D = % на инхибиране

A = % увреждания (20 % пропускане на флуоресцеин)

B = % пропускане на флуоресцеин < A

C = % пропускане на флуоресцеин > A

M_C = Концентрация (mg/ml) на C

M_B = Концентрация (mg/ml) на B

Граничната стойност на FL_{20} за прогнозирането на корозивно/силно дразнещо действие на химикали върху очите е дадена по-долу:

FL_{20} (mg/ml)	C&L по GHS на ООН	C&L по Регламент CLP на ЕС	C&L по EPA на САЩ
≤ 100	Категория 1	Категория 1	Категория I

C&L: класифициране и етикетиране

Методът за изпитване FL се препоръчва само за идентифициране на разтворими във вода химикали с корозивно и силно дразнещо действие върху очите (категория 1 по GHS на ООН и Регламент CLP на ЕС категория 1, категория I по EPA) (вж. точки 1 и 10).

С цел да се идентифицират разтворими във вода химикали (вещества и смеси) (3) (6) (7), като „предизвикващи сериозно увреждане на очите“ (категория 1 по GHS на ООН/Регламент CLP на ЕС) или като „химикал с корозивно или силно дразнещо действие върху очите“ (категория I по EPA на САЩ), изпитваният химикал следва да предизвиква стойност FL_{20} при ≤ 100 mg/ml.

Приемливост на резултатите

Средната стойност при максимално пропускане на флуоресцеин (x) трябва да е по-голяма от 4 000 (вж. точка 31), средната стойност при 0 % пропускане (y) трябва да е равна на 300 или по-малка, а средната стойност при пропускане 100 % (z) трябва да е между 3 700 и 6 000.

Едно изпитване се смята за приемливо, ако положителната контрола е предизвикала от 20 % до 40 % увреждане на клетъчния слой (измерване като % пропускане на флуоресцеин).

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Данни

Данните от отделните гнезда с повторения (напр. стойностите за интензитета на флуоресценцията и данните за изчисления процент FL за всеки изпитван химикал, включително класифициране) следва да бъдат представени в таблична форма за всяка серия. Освен това следва да се протоколират средните стойности ± стандартното отклонение на отделните измервания на повторения във всяка серия.

▼ M7**Протокол от изпитването**

Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитвани химикали и химикали за контроли

- Наименование(-я) на химикала, като например структурното наименование, използвано от Службата за химични индекси CAS, следвано от други наименования, ако са известни;
- CAS номер на химикала, ако е известен;
- Чистота и състав на веществото или сместа (в тегловни проценти), доколкото се разполага с такава информация;
- Физични и химични свойства, относими към провеждането на изследването (напр. агрегатно състояние, летливост, рН, стабилност, разтворимост във вода, клас на химикала);
- Обработка на изпитвания/контролния химикал преди изпитването, ако е приложимо (напр. нагряване, стриване);
- Условия за съхранение:

Обосновка на използвания метод за изпитване и протокол

- Следва да включва съображения относно областта на приложимост и ограниченията на метода за изпитване;

Условия на изпитване

- Описание на използваната клетъчна система, включително сертификат за автентичност и микоплазмен статус на клетъчната линия;
- Подробни данни за използваната процедура за изпитване;
- Използвана концентрация (концентрации) на изпитвания химикал;
- Продължителност на експозицията на изпитвания химикал;
- Продължителност на инкубирането с флуоресцеин;
- Описание на всякакви изменения на процедурата за изпитване;
- Описание на използваните критерии за оценка;
- Позоваване на данни от предходни периоди за модела (напр. отрицателни и положителни контроли, химикали за сравнение, ако е приложимо);
- Информация относно техническата компетентност, демонстрирана от лабораторията;

Резултати

- Таблично представяне на данните за отделните изпитвани химикали и контролите за всяка серия и за всяко измерване на повторение (включително индивидуални резултати, средни стойности и стандартни отклонения);
- Получената класификация (класификации) с позоваване на модела за прогнозиране и/или критериите за решението, които са използвани;
- Описание на други наблюдавани ефекти;

▼ M7

Обсъждане на резултатите.

— Следва включва съображения във връзка с резултати, от които не може да се достигне до заключение (точка 35: FL₂₀ > 100 mg/ml) и по-нататъшно изпитване;

Заклучения

ЛИТЕРАТУРА

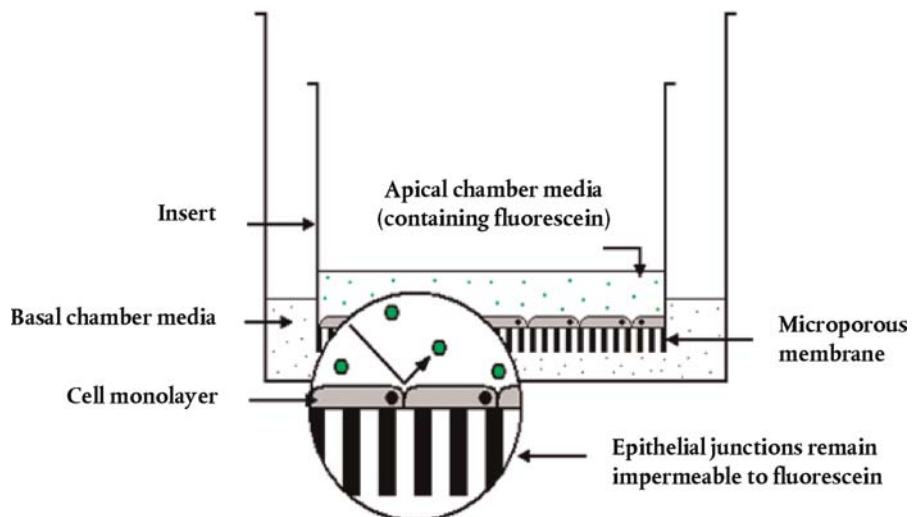
- (1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. На разположение на адрес: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]
- (2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.
- (4) Scott, L. *et al.* (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9
- (5) Глава Б.5 от настоящото приложение, *Остра токсичност: очно дразнещо/корозивно действие*
- (6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). На разположение на адрес: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>]
- (7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.
- (8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.

▼ M7

Допълнение 1

**СХЕМА НА MDCK КЛЕТКИ, ОТГЛЕЖДАНИ ВЪРХУ МЕМБРАНА
НА ВЛОЖКА, ЗА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ FL**

Конфлуентен слой от MDCK клетки се отглежда върху полупропускливата мембрана на вложка. Вложките се поставят в гнездата на 24-гнездови плаки.



Схема, взета от: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

▼ M7

Допълнение 2

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: степента на близост между резултатите от метода за изпитване и приетите референтни стойности. Това е мярка за характеристиките на метода за изпитване и аспект на „относимостта“. Терминът често се използва взаимозаменяемо с термина „съответствие“, за да се обозначи относителният дял на правилните резултати при даден метод за изпитване.

Химикал: Вещество или смес.

Категория 1 по ЕРА: Химикали, които предизвикват корозивно действие (необратимо разрушаване на очна тъкан) или корнеални усложнения или дразнене, траещи повече от 21 дни (2).

Регламент CLP на ЕС (Регламент (ЕО) № 1272/2008 относно класифицирането, етикетването и опаковането на вещества и смеси): въвежда в законодателството на Европейския съюз (ЕС) системата GHS на ООН за класифицирането на химикали (вещества и смеси).

Процент неверни отрицателни резултати: Делът на всички положителни химикали, невярно определени като отрицателни по даден метод за изпитване. Това е един от показателите за характеристиките на метода за изпитване.

Процент неверни положителни резултати: Делът на всички отрицателни химикали, невярно определени като положителни по даден метод за изпитване. Това е един от показателите за характеристиките на метода за изпитване.

FL₂₀: Може да се оцени чрез определяне на концентрацията, при която изпитваният химикал предизвиква 20 % пропускане на флуоресценция през клетъчния слой.

Пропускане на флуоресценция: количеството флуоресценция, което се пропуска през клетъчния слой, измерено спектрофлуорометрично.

GHS (Глобална хармонизирана система на Организацията на обединените нации (ООН) за класифициране и етикетване на химикали): система, предлагаща класифициране на химикали (вещества и смеси) според стандартизираните видове и степени на физическа, здравна и екологична опасност и разглеждаща съответни съобщителни елементи, като например пиктограми, сигнални думи, предупреждения за опасност, препоръки за безопасност и информационни листовки за безопасност, така че те да съобщават информация за тяхното неблагоприятно въздействие с оглед защита на хората (включително работодатели, работещи, служители в транспорта, потребители и аварийни служители) и на околната среда.

Категория 1 по GHS: Предизвикване на тъканно увреждане на окото или сериозно физическо влошаване на зрението след прилагане на изпитван химикал към предната повърхност на окото, което не е напълно обратимо в рамките на 21 дни след прилагането.

Опасност: Вътрешно присъщо свойство на даден агент или ситуация, притежаващо потенциал да предизвика неблагоприятни ефекти когато един организъм, система или (суб-)популация бъдат експонирани на този агент.

Смес: използва се в контекста на GHS на ООН като смес или разтвор, съставен от две или повече вещества, които не си взаимодействат.

Отрицателна контрола: Нетретирано повторение, съдържащо всички компоненти на дадена изпитвана система. Тази проба се обработва с пробите, третирани с изпитвания химикал, и с други контролни проби, за определяне дали разтворителят взаимодейства с изпитваната система.

▼ M7

Некласифицирани: Химикали, които не са класифицирани като категория 1, 2A или 2B по GHS на ООН; категория 1 или 2 по CLP на ЕС; или химикали с дразнещо действие върху очите от категория I, II или III по EPA.

Химикал с корозивно действие върху очите: а) химикал, който предизвиква необратимо тъканно увреждане на окото. б) химикали, които са класифицирани като категория 1 по GHS на ООН; категория 1 по CLP на ЕС; или химикали с дразнещо действие върху очите от категория I по EPA.

Химикал с дразнещо действие върху очите: а) химикал, който предизвиква обратимо изменение на окото след прилагане върху предната повърхност на окото; б) химикали, които са класифицирани като категория 2A или 2B по GHS на ООН; категория 2 по CLP на ЕС; или химикали с дразнещо действие върху очите от категория II или III по EPA.

Химикал със силно дразнещо действие върху очите: химикал, който предизвиква тъканно увреждане на окото след прилагане върху предната повърхност на окото, което не е обратимо до 21 дни след прилагането или причинява сериозно физическо влошаване на зрението. б) химикали, които са класифицирани като категория 1 по GHS на ООН; категория 1 по CLP на ЕС; или химикали с дразнещо действие върху очите от категория I по EPA.

Положителна контрола: повторение, съдържащо всички компоненти на дадена изпитвана система, и третирано с химикал, за който е известно, че предизвиква положителен отклик. За да гарантира, че може да се направи оценка на варирането на отклика в положителната контрола във времето, големината на положителния отклик не следва да е прекомерна.

Химикали за изпитването за пригодност: подгрупа от списъка с референтните химикали, която може да се използва от лабораториите, които не са извършвали предходни такива изпитвания, за да демонстрират пригодност за извършване на валидирания референтен метод за изпитване.

Относителност: описание на взаимовръзката между изпитването и ефекта, представляващ интерес, и дали тя е значима и полезна за определена цел. Това е степента, в която изпитването правилно измерва или прогнозира биологичния ефект, представляващ интерес. Относителността включва разглеждането на точността (съответствието) на метода за изпитване (8).

Надеждност: мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да се приложи възпроизводимо в една и съща лаборатория и в различни лаборатории по различно време, при използване на един и същи протокол. Оценката за нея се прави като се изчислява вътрешнолабораторната и междулабораторната възпроизводимост и вътрешнолабораторната повторяемост.

Заместващо изпитване: изпитване, предназначено да замести изпитване, което се използва рутинно и е прието за определяне на опасността и/или оценка на риска, и за което е установено, че предоставя равностойна или по-добра защита на здравето на хората или животните или на околната среда, според приложимото, в сравнение с приетото изпитване, за всички възможни изпитвани ситуации и химикали.

Чувствителност: Относителният дял от всички положителни/активни химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на метода за изпитване, който предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на относителността на метода за изпитване (8).

Сериозно увреждане на очите: предизвикване на тъканно увреждане на окото или сериозно физическо влошаване на зрението след прилагане на изпитван химикал към предната повърхност на окото, което не е напълно обратимо в рамките на 21 дни след прилагането.

Контрол на разтворител/носител: Нетретирана проба, съдържаща всички компоненти на дадена изпитвана система, включително разтворителя или носителя, която се обработва с пробите, третирани с изпитвания химикал,

▼ M7

и с други контролни проби, за определяне на базовия отклик при пробите, третиран с изпитвания химикал, разтворен в същия разтворител или носител. Когато се изпитва с паралелна отрицателна контрола тази проба показва също дали разтворителят или носителът взаимодействат с изпитваната система.

Специфичност: Относителният дял от всички негативни/неактивни химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на метода за изпитване, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на относимостта на метода за изпитване.

Вещество: В контекста на GHS на ООН се използва за химични елементи и техни съединения, в естествено състояние, или получени чрез какъвто и да е производствен процес, включително всякаква добавка, необходима за запазването на устойчивостта на продукта и всякакъв примес, който е резултат от използвания процес, но с изключение на всякакви разтворители, които могат да се отделят без да се наруши устойчивостта на веществото или да се промени неговият състав.

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

Стратегия за поетапно изпитване: стратегия за поетапно изпитване, при която цялата съществуваща информация за даден изпитван химикал се разглежда по конкретен ред, като на всеки етап се прилага процес, основан на тежестта на доказателствата, за определяне дали съществува достатъчно информация за вземане решение за класифициране с оглед на опасността, преди да се премине към следващия етап. Ако потенциалът за дразнещо действие на даден изпитван химикал може да се определи въз основа на съществуващата информация, не се налага допълнително изпитване. Ако потенциалът за дразнещо действие на даден изпитван химикал не може да се определи въз основа на съществуващата информация, се провежда процедура за поетапно последователно изпитване върху животни, докато стане възможно да се направи ясно класифициране.

Валидиран метод за изпитване: метод за изпитване, за който са извършени изследвания за валидиране за определяне на относимостта (включително на точността) и надеждността му за конкретна цел. Важно е да се отбележи, че един валидиран метод за изпитване може да не притежава достатъчно ефективност по отношение на точността и надеждността си, за да се счита за приложим за предлаганата цел (8).

Процес, основан на тежестта на доказателствата: Процесът на отчитане на силните и слаби страни на различни видове информация за достигане до дадено заключение относно потенциалната опасност на даден химикал, и в подкрепа на това заключение.

▼ M7

Допълнение 3

ХИМИКАЛИ ЗА ИЗПИТВАНЕ ЗА ПРИГОДНОСТ ЗА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ FL

Преди рутинното използване на настоящия метод за изпитване, лабораториите следва да докажат техническата си компетентност като правилно определят класификацията за корозивност за очите за 8-те химикала, препоръчани в Таблица 1. Тези химикали са подбрани да представляват размаха на отклите за местно дразнещо/корозивно действие върху очите, основан на резултати от изпитването *in vivo* със заешки очи (TG 405, МИ Б.5(5)) (т.е. категории 1, 2A, 2B, или без класифициране по GHS на ООН). Независимо от това, като се има предвид валидираната полза от изследването FL (т.е. за определяне само на химикали с корозивно/силно дразнещо действие върху очите), съществуват само два резултата от изпитването за целите на класифицирането на опасност (корозивно/силно дразнещо действие или действие, различно от корозивно/силно дразнещо действие) за доказване на пригодността. Други критерии за подбор са били това, че химикалите са налични в търговската мрежа, че са налични висококачествени *in vivo* референтни данни и че са налични висококачествени данни от метода за изпитване FL. По тази причина химикалите за изпитване на пригодност са подбрани от „Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing“ (8), който е използван за валидирането със задна дата на метода за изпитване FL.

Таблица 1

Препоръчвани химикали за доказване на техническа компетентност по отношение на FL

Химикал	CAS №	Химичен клас ⁽¹⁾	Агрегатно състояние:	<i>In vivo</i> класифициране ⁽²⁾	<i>In vitro</i> класифициране ⁽³⁾
БензалкоНИЕВ хлорид (5 %)	8001-54-5	Ониевое съединение	Течност	Категория 1	Химикал с корозивно/силно дразнещо действие
Прометазинхидрохлорид	58-33-3	Амин/амидин, хетероциклено, сярасъдържащо органично съединение	Твърдо	Категория 1	Химикал с корозивно/силно дразнещо действие
Натриев хидроксид (10 %)	1310-73-2	Силна основа	Течност	Категория 1	Химикал с корозивно/силно дразнещо действие
Натриев лаурилсулфат	151-21-3	Карбоксилна киселина (сол)	Течност	Категория 1	Химикал с корозивно/силно дразнещо действие
4-карбоксибензалдехид	619-66-9	Карбоксилна киселина, алдехид	Твърдо	Категория 2(A)	Без корозивно/без силно дразнещо действие
Амониев нитрат	6484-52-2	Неорганична сол	Твърдо	Категория 2(A)	Без корозивно/без силно дразнещо действие
Етил-2-метилацетат	609-14-3	Кетон, естер	Течност	Категория 2(B)	Без корозивно/без силно дразнещо действие
Глицерол	56-81-5	Алкохол	Течност	Без категория	Без корозивно/без силно дразнещо действие

Съкращения: CAS № = регистрационен номер по Службата за химични индекси.

⁽¹⁾ за всеки изпитван химикал са определени химични класове, като за целта се използва стандартна схема за класификация, базираща се на системата за класификация MeSH (National Library of Medicine Medical Subject Headings) (на разположение на адрес: <http://www.nlm.nih.gov/mesh>)

⁽²⁾ Базира се на резултати от *in vivo* изпитване със заешки очи (ОИСП TG 405, МИ Б.5) и с използване на GHS на ООН и CLP на ЕС.

⁽³⁾ Въз основа на резултатите, получени с FL (INVITTOX Протокол № 71(6))

▼ M7

**Б.62. *IN VIVO* КОМЕТНО ИЗСЛЕДВАНЕ В АЛКАЛНА СРЕДА
ВЪРХУ БОЗАЙНИЦИ****ВЪВЕДЕНИЕ**

Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 489 (2016). Кометното *in vivo* (чрез гелна електрофореза на единични клетки) изследване в алкална среда върху бозайници (опростено наричано по-нататък кометно изследване) се използва за откриване на скъсвания във веригата на ДНК в клетки или ядра, изолирани от множество тъкани на животни, обикновено гризачи, които са били експонирани на потенциално генотоксичен материал (материали). Кометното изследване е преразгледано и са публикувани препоръки от различни експертни групи (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Настоящият метод за изпитване е част от поредица от методи за изпитване от областта на генетичната токсикология. Разработен е документ на ОИСП, съдържащ ясна информация относно изпитванията в областта на генетичната токсикология, и преглед на актуалните изменения на посочените Насоки (11).

Целта на кометното изследване е да бъдат идентифицирани химикали, които причиняват увреждане на ДНК. В алкални условия (> pH 13) кометното изследване може да открива едноверижни или двойноверижни скъсвания, произтичащи например от пряко взаимодействие с ДНК, алкално лабилни сайтове или като последица от временни скъсвания във веригата на ДНК, произтичащи от ексцизионна репарация на ДНК. Тези скъсвания във веригата могат да са поправими, което води до отсъствие на трайно въздействие, могат да са смъртоносни за клетката или да бъдат фиксирани в мутация, което доведе до постоянна жизнеспособна промяна. Те могат също така да доведат до увреждане на хромозомите, което също така е свързано с много човешки заболявания, включително рак.

Официалното валидиращо изпитване на *in vivo* кометното изпитване върху гризачи беше извършено в периода 2006—2012 г., координирано от Японския център за валидиране на алтернативни методи (JaCVAM) съвместно с Европейския център за валидиране на алтернативни методи (ECVAM), Междуведомствения координационен комитет за валидиране на алтернативни методи (ICCVAM) и Междуведомствения център за оценка на алтернативните методи (NICEATM) (12). Настоящият метод за изпитване включва препоръчителната употреба и ограниченията на кометното изследване, и се основава на окончателния протокол, използван във валидиращото изпитване (12), и върху допълнителни относими публикувани и непубликувани (собственост на лаборатории) данни.

Определенията на ключови термини са дадени в допълнение 1. Следва да се отбележи, че в това изпитване могат да бъдат използвани множество различни платформи (микроскопски предметни стъкла, гелни платформи, 96-гнездни плаки и др.). За удобство в останалата част на настоящия документ се използва терминът „предметно стъкло“, който обхваща и всички други платформи.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Кометното изследване е метод за измерване на скъсвания във веригата на ДНК в еукариотни клетки. Единични клетки/ядра, включени в агарозен гел върху предметно стъкло се лизират с дегергент и висока концентрация на сол. Това лизиране като стъпка разгражда клетъчните и ядрените мембрани и позволява пропускането на бримки на навита ДНК, обикновено наричани нуклеоиди, и ДНК фрагменти. При електрофорезата при висок pH се получават структури, наподобяващи комети, които могат да се наблюдават с помощта на флуоресцентна микроскопия при използване на подходящи флуоресцентни оцветители; ДНК фрагментите мигрират от „главата“ в „опашката“ въз основа на размера им и тяхната големина и интензитетът на опашката на кометата спрямо общия интензитет (главата плюс опашката) отразява количеството на скъсванията на ДНК (13) (14) (15).

In vivo кометното изследване в алкална среда е от особено значение за оценка на генотоксичната опасност, поради това че отклиците в изследването зависят от *in vivo* абсорбцията, разпределението, метаболизма и екскрецията (APME), а също и от процесите на поправка на ДНК. Те могат да варират според животинския вид, тъканта и типа увреждане на ДНК.

▼ M7

За отговаряне на изискванията за хуманно отношение към животните, по-специално за намаляване на използването на животни (3-те „R“ — заместване, намаляване, облекчаване), това изпитване може също да бъде интегрирано в други токсикологични изследвания, напр. изпитвания за токсичност с повтаряща се доза (10) (16) (17), или крайната точка може да се комбинира с други крайни точки за генотоксичност, като тези в *in vivo* изпитването за микроядра в еритроцити на бозайници (18) (19) (20). Кометното изследване най-често се извършва върху гризачи, въпреки че е прилагано към други бозайници и видове, различни от бозайници. Използването на видове, различни от гризачи, следва да е обосновано от научна и етична гледна точка за всеки отделен случай и категорично се препоръчва кометното изследване да се извършва само върху видове, различни от гризачи, като част от друго изследване за токсичност, а не като самостоятелно изпитване.

Изборът на път на експозиция и на тъкан (тъкани), които да бъдат проучени, трябва да се определя въз основа на цялото налично/съществуващо познание за изпитваните химикали, напр. предвиден/очакван път на експозиция на човека, метаболизъм и разпределение, потенциал за ефекти в точката на контакт, структурни признаци на токсичност, други данни за генотоксичност или токсичност, и целта на изследването. По този начин, когато е уместно, генотоксичният потенциал на изпитвания химикал може да се изследва в прицелната тъкан (тъкани) за канцерогенни и/или други токсични ефекти. Изследване също се счита за полезно за по-нататъшното проучване на генотоксичността, установена чрез *in vitro* система. Уместно е да се извърши *in vivo* кометно изследване в представляваща интерес тъкан, когато може разумно да се очаква, че представляващата интерес тъкан ще бъде достатъчно експонирана.

Изследването е максимално широкообхватно валидирано в соматични тъкани на мъжки плъхове в кръгови изследвания, като например изпитването на JaCVAM (12) и в Rothfuss *et al.*, 2010 (10). В международното изпитване за валидиране на JaCVAM бяха използвани черен дроб и стомах. Черен дроб, защото е това е най-активният орган в метаболизма на химикалите и също така често е прицелен орган при канцерогенност. Стомах, защото обикновено е първото място за контакт за химикали след експозиция по орален път, въпреки че други области на стомашно-чревния тракт, като например дванадесетопръстникът и празното черво, също следва да се разглеждат като тъкани, представляващи точка на контакт, и могат да се разглеждат като по-относими при хората, отколкото жлезистия стомах на гризачите. Трябва да се положат грижи да се гарантира, че тези тъкани не са експонирани на прекомерно високи концентрации на изпитвания химикал (21). По принцип техниката е приложима за всички тъкани, от които могат да бъдат получени анализируеми суспензии от единични клетки/ядра. Собствени данни от няколко лаборатории доказват нейното успешно прилагане по отношение на множество различни тъкани и има много публикации, показващи приложимостта на техниката по отношение на органи или тъкани, различни от черен дроб и стомах, напр. празно черво (22), бъбреци (23) (24), кожа (25) (26) или пикочен мехур (27) (28), клетки от бял дроб и бронхоалвеоларен лаваж (относими към проучвания на инхалирани химикали) (29) (30), и също така са извършвани изпитвания в много органи (31) (32).

Независимо от това, че съществува интерес към генотоксичните ефекти в зародишни клетки, трябва да се отбележи, че стандартното кометно изследване в алкална среда, както е описано в настоящия метод за изпитване, не се счита за подходящо за измерване на скъсвания във веригата на ДНК в зрели зародишни клетки. Тъй като в един преглед на литературата относно използването на кометното изследване за генотоксичност за зародишните клетки (33) се посочват високи и вариращи фоновни нива при уврежданията на ДНК, счита се, че са необходими изменения в протокола, заедно с подобрени проучвания за стандартизация и валидиране, преди кометното изследване върху зрели зародишни клетки (например сперма) да може да бъде включено в метода за изпитване. Освен това препоръчаният режим на експозиция, описан в настоящия метод на изпитване, не е оптимален, и за извършването на съдържателен анализ на скъсванията във веригата на ДНК в зрели сперматозоиди са необходими по-дълготрайни експозиции и периоди на пробовземане. В литературата са описани генотоксични ефекти, измерени чрез кометното изследване, в тестикуларни клетки на различни етапи на диференциране (34) (35). Следва да се отбележи обаче, че гонадите съдържат смес от соматични и зародишни клетки. По тази причина, положителни резултати в цялата гонада (тестис) не са непременно показателни за уврежданията в зародишни клетки; независимо от това, те посочват, че изпитваният химикал (химикали) и/или неговите метаболити са достигнали до гонадата.

▼ **M7**

Омрежванията не могат да бъдат открити по надежден начин със стандартните опитни условия за кометното изследване. При определени модифицирани опитни условия омрежванията ДНК-ДНК и ДНК-белтък и други изменения в базите, като например окислените бази, могат да бъдат открити (23) (36) (37) (38) (39). Но е необходимо да се извърши допълнителна работа, за да се характеризират адекватно необходимите изменения в протокола. По този начин откриването на омрежващи агенти не е основната цел на изследването, както е описано тук. Изследването е неподходящо за откриване на анеугени, дори и с изменения.

Поради настоящото състояние на познанията, с *in vivo* кометното изследване са свързани няколко допълнителни ограничения (вж. допълнение 3). Очаква се методът за изпитване да бъде преразгледан в бъдеще и, ако е необходимо, преработен в светлината на придобития опит.

Преди използването на метода за изпитване по отношение на смес с цел генериране на данни за планирана регулаторна цел, следва да се разгледа въпросът дали той може да даде адекватни резултати за тази цел и, ако е така, защо. Такива съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Животните се експонират на въздействието на изпитвания химикал по подходящ път. Подробно описание на дозирането и вземането на проби е дадено в точки 36—40. В избрания момент (моменти) на пробовземане се извършва дисекция на тъканите, представляващи интерес, и се приготвят суспензии от единични клетки/ядра (ако се прецени, че е полезно, може да се извърши *in situ* перфузия, например при черен дроб), които се поставят в агарозен гел, така че да бъдат обездвижени върху предметни стъкла. Клетките/ядрата се третират с лизиращ буфер за отстраняване на клетъчната и/или ядрената мембрана, и се експонират на силни основи, напр. с $\text{pH} \geq 13$, за да се даде възможност за разплитане на ДНК и отделяне на освободените ДНК бримки и фрагменти. След това ядрената ДНК в агара се подлага на електрофореза. Нормалните нефрагментирани ДНК молекули остават на това място в агара, където са били ядрените ДНК, докато всички останали, фрагментираните ДНК и освободените ДНК бримки мигрират към анода. След електрофореза ДНК се визуализира с помощта на подходящ флуоресцентен оцветител. Препаратите следва да се анализират с помощта на микроскоп и системи за изцяло автоматичен или полуавтоматичен анализ на изображения. Количеството на ДНК, мигрирала по време на електрофорезата, и разстоянието на миграцията отразяват количеството и размера на фрагментите от ДНК. При кометното изследване има няколко крайни точки. За оценка на увреждането на ДНК се препоръчва съдържанието на ДНК в опашката (% ДНК в опашката или % интензитет на опашката) (12) (40) (41) (42). След анализ на достатъчен брой ядра данните се анализират с подходящи методи с оглед преценяване на резултатите от анализа.

Следва да се отбележи, че изменението на различни аспекти на методологията, включително приготвянето на пробите, условията на електрофорезата, параметрите за визуален анализ (напр. интензитет на оцветяването, интензитет на светлината от крушката на микроскопа, поставяне на филтри върху микроскопа и динамични параметри на камерата) и условията на околната среда (напр. фоново осветление) са били проучени и могат да засегнат миграцията на ДНК (43) (44) (45) (46).

ПРОВЕРКА НА ПРИГОДНОСТТА НА ЛАБОРАТОРИЯТА

Всяка лаборатория трябва да установи пригодността си за извършване на кометното изследване чрез доказване на способността си за получаване на суспензии от единични клетки или ядра с достатъчно добро качество за всяка прицелна тъкан (тъкани) за всеки използван животински вид. Качеството на препаратите ще бъдат оценявано на първо място с това, че % ДНК в опашката за животни, третирани с носител, следва да попада в рамките на възпроизводим нисък обхват. Настоящите данни показват, че средната за групата стойност на % ДНК в опашката (въз основа на средната стойност на медианите — вж. точка 57 за подробна информация относно тези термини) в черен дроб на плъх следва за предпочитане да не превишава 6 %, което би съответствало на стойностите от изпитването за валидиране на JaCVAM (12) и от други публикувани и собствени данни. Към настоящия момент няма достатъчно данни за формулиране на препоръки за оптимални или приемливи обхвати за други тъкани. Това не изключва използването на други тъкани, ако това е обосновано. Протоколът от изпитването следва да осигури подходящ преглед на параметрите на

▼ M7

кометното изследване в тези тъкани във връзка с публикуваната литература или със собствени данни. На първо място, желателно е нисък обхват на % ДНК в опашката при контролите да предоставя достатъчен динамичен обхват за откриване на положителен ефект. На второ място, всяка лаборатория трябва да може да възпроизвежда очаквани отклици за мутагени с пряко действие и промутагени, с различни начини на действие, както е предложено в таблица 1 (точка 29).

Вещества с положителен отклик могат да бъдат избрани например от изпитването за валидиране на JaCVAM (12) или от други публикувани данни (вж. точка 9), ако е уместно, с обосновка, и ясно показващи положителни отклици в тъканите, представляващи интерес. Способността за откриване на слаби ефекти на познати мутагени, например EMS при ниски дози, следва също да бъде доказана, например чрез установяване на зависимостта доза-отклик с подходящ брой дози и интервал между тях. Първоначалните усилия следва да се насочат към установяване на пригодността по отношение на най-обичайно използваните тъкани, като черен дроб от гризачи, при които може да се направи сравнение със съществуващите данни и очакваните резултати (12). Едновременно с това могат да бъдат събрани данни за други тъкани, напр. стомах/дванадесетопръстник/празно черво, кръв и други. Лабораторията трябва да докаже пригодността си за всяка отделна тъкан от всеки животински вид, върху който планира извършване на изпитване, както и че в тази тъкан може да бъде получен приемлив положителен отклик с познат мутаген (напр. EMS).

Следва да бъдат събрани данни за контролите на носител/отрицателните контроли, за да се докаже възпроизводимостта на отрицателните отклици и да се гарантира, че техническите аспекти на изследването са били правилно контролирани, или да се предложи необходимост от установяване на нови обхвати за контролите от предходни изследвания (вж. точка 22).

Следва да се отбележи че, доколкото при аутопсия могат да бъдат събрани и обработени за кометно изследване множество тъкани, лабораторията трябва да бъдат пригодна по отношение на събирането на множество тъкани от едно единствено животно, като по този начин се гарантира, че няма загуба на никакво потенциално увреждане на ДНК и че не се накърнява кометното изследване. Продължителността на периода от умъртвяването до отстраняването на тъканите за обработка може да бъде от решаващо значение (вж. точка 44).

При придобиването на пригодност по отношение на настоящото изпитване трябва да се вземе предвид хуманното отношение към животните и поради това при придобиването на компетентност в различните аспекти на изпитването могат да се използват тъкани от животни, използвани при други изпитвания. Освен това, може да не е необходимо провеждането на пълно изследване по време на етапите на установяване на нов метод на изпитване в дадена лаборатория и при придобиването на необходимите умения могат да се използват по-малко животни или концентрации на изпитване.

Данни за контролите за предходни периоди

В хода на проучванията на пригодността лабораторията следва да изгради база данни за предходни периоди, с оглед установяване на обхвати и разпределения за положителните и отрицателните контроли, за относимите тъкани и животински видове. В литературата (47) могат да се намерят препоръки относно начина на създаване и използване на данни от предходни периоди (т.е. критерии за включване и изключване на данни в данните за предходни периоди и критериите за приемливост за даден опит). Различните тъкани и различните животински видове, както и различните носители и пътища на прилагане, могат да дадат различни стойности за % ДНК в опашката при отрицателните контроли. Поради това по отношение на отрицателните контроли е важно да се установят обхвати за всяка тъкан и животински вид. Лабораторията трябва да използва методи за контрол на качеството, като например контролни карти (напр. С-карти или карти за средна стойност (X-bar) (48)), за определяне на варирането на данните им, и за доказване, че методологията е „под контрол“ в техните лаборатории. Подборът на подходящи вещества за положителни

▼ **M7**

контроли, обхвати на дозиране и опитни условия на изпитването (напр. условия на електрофорезата) също може да се наложи да бъде оптимизиран с оглед на откриване на слаби ефекти (вж. точка 17).

Всички промени в опитния протокол следва да бъдат разглеждани от гледна точка на тяхната съгласуваност със съществуващите бази данни на дадената лаборатория за контролите за предходни периоди. Всички значителни несъответствия следва да водят до създаването на нова база данни за контролите за предходни периоди.

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

Обичайно се използват най-разпространените лабораторни породи здрави, млади, полово зрели гризачи (на възраст 6-10 седмици в началото на третирането, макар че малко по-възрастни животни също са приемливи). Избор на животинския вид гризачи следва да се основава на i) видовете, използвани в други изследвания за токсичност (за да се даде възможност за корелация на данните и за интегрирани изследвания), ii) видовете, развили тумори в изследване за канцерогенност (при проучване на механизма на карциногенезата), или iii) видове с метаболизъм, който е най-относим към хората, ако са известни. В настоящото изпитване обикновено се използват плъхове. Независимо от това, могат да се използват други видове, ако това е обосновано от научна и етична гледна точка.

Условия на отглеждане и хранене на животните

За гризачи в помещението, в което се намират опитните животни, температурата в идеалния случай следва да е 22 °C (± 3 °C). В идеалния случай относителната влажност следва да бъде 50—60 %, като е поне 30 % и за предпочитане да не превишава 70 %, освен по време на почистване на помещението. 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 този път. Гризачите трябва да бъдат разпределени в малки групи (не повече от пет) от един и същ пол, ако не се очаква агресивно поведение. Животните могат да се настаняват отделно само ако това е научно обосновано. Твърдите подове следва да се използват винаги, когато е възможно, тъй като подовете с мрежесто покритие могат да причинят сериозни увреждания (49). Трябва да се осигури подходящо облагородяване на жизнената среда.

Подготовка на опитните животни

Животните се разпределят на случаен принцип в контролни групи и групи за третиране. На животните се дава уникална идентификация и те се аклиматизират към лабораторните условия в продължение на поне пет дни преди началото на третирането. Като метод, който идентифицира по уникален начин животните, трябва да се използва най-малко инвазивният метод. Подходящите методи включват опръстеняване, поставяне на марка, микрочип или биометрична идентификация. Изрязването на уши или пръсти не е научно обосновано в тези изпитвания. Клетките се подреждат така, че да бъдат сведени до минимум възможните ефекти, дължащи се на местоположение на клетката. В началото на изследването вариациите в теллото на животните следва да са минимални и да не превишават ± 20 %.

Приготвяне на дозите

Твърдите изпитвани химикали следва да се разтворят или суспендират в подходящи носители, или да се смесят в хранителния режим или в питейната вода преди дозирането на животните. Течните изпитвани химикали могат да се дозират директно или да се разреждат преди дозиране. При експозиция чрез инхалация изпитваните химикали могат да се прилагат като газ, пари или аерозол с твърда/течна фаза, в зависимост от техните физични и химични свойства (50) (51).

Следва да се използват пресни смеси на изпитвания химикал, освен ако данните за стабилността показват, че е допустимо съхранение и посочват подходящите условия за съхранение.

▼ **M7****Условия на изпитване***Носител*

Носителят не следва да има токсични ефекти при използваните обеми на доза, а също така не следва да има съмнения за химическа реакция между него и изпитваните химикали. Ако се използват други освен добре познатите носители, включването им следва да се подкрепи от референтни данни за съвместимостта им по отношение на изпитвани животни, път на прилагане и крайна точка. Препоръчва се винаги, когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на вода като разтворител/носител. Следва да се отбележи, че някои носители (по-специално вискозни носители) могат да предизвикат възпаление и да увеличат фоновите нива на скъсванията във веригата на ДНК в точката на контакт, особено при много прилагания.

Контроли*Положителни контроли*

Към момента обичайно във всяко изпитване следва да се включи група от минимум 3 анализируеми животни от един пол, или от всеки пол, ако се използват и двата пола (вж. точка 32), третиран с вещество за положителна контрола. В бъдеще може да е възможно да се докаже пригодност, която да е достатъчна за намаляване на необходимите положителни контроли. Ако се използват множество моменти на пробовземане (напр. с протокол е единствено прилагане), необходимо е положителни контроли да се включат само при един от моментите на пробовземане, но следва да се гарантира балансиран план (вж. точка 48). Не е необходимо прилагането на вещества за паралелни положителни контроли по същия път като изпитвания химикал, въпреки че е важно, че същият път следва да бъде използван при измерването на ефекти в точката на контакт. Следва да се докаже, че веществата за положителни контроли предизвикват скъсвания във веригата на ДНК във всички тъкани, представляващи интерес във връзка с изпитвания химикал, и е вероятно EMS да бъде избраната положителна контрола, тъй като предизвиква скъсвания във веригата на ДНК във всички тъкани, които са били изследвани. Дозите на веществата за положителни контроли следва да бъдат подбрани така, че да се получат умерени ефекти, въз основа на които да може да се извърши критична оценка на параметрите и на чувствителността на изследването, и могат да се основават на кривите доза-отклик, установени от лабораторията по време на доказването на пригодността. Процентът на ДНК в опашката при животни за паралелни положителни контроли следва да бъде съгласуван с обхвата, предварително определен от лабораторията за всяка отделна тъкан и време на пробовземане за този животински вид (вж. точка 16). Примери за вещества за положителни контроли и някои от техните прицелни тъкани (при гризачи) са включени в таблица 1. Могат да бъдат избрани вещества, различни от посочените в таблица 1, ако това е научно обосновано.

*Таблица 1***Примери за вещества за положителни контроли и някои от техните прицелни тъкани**

Вещества и CAS RN №
Етилов метансулфонат (CAS RN 62-50-0) за всички тъкани
Етилниитрозоуреа (CAS RN 759-73-9) за черен дроб и стомах, дванайсетопръстник или празно черво
Метилев метансулфонат (CAS RN 66-27-3) за черен дроб, стомах, дванайсетопръстник или празно черво, клетки от бели дробове и бронхоалвеоларен лаваж (БАЛ), бъбреци, пикочен мехур, бял дроб, тестис и костен мозък/кръв
<i>N</i> -метил- <i>N'</i> -нитро- <i>N</i> -нитрозогуанидин (CAS RN: 70-25-7) за стомах, дванайсетопръстник или празно черво
1,2-Диметилхидразин 2HCl (CAS RN 306-37-6) за черен дроб и черва
<i>N</i> -метил- <i>N</i> -нитрозоуреа (CAS RN 684-93-5) за черен дроб, костен мозък, кръв, бъбреци, стомах, празно черво и мозък.

▼ **M7***Отрицателни контроли*

За всяко изпитване, за всеки момент на пробовземане и за всяка тъкан следва да се включи група животни за отрицателни контроли, третирани само с носител, а във всяко друго отношение третирани по същия начин като третираните групи. Процентът на ДНК в опашката при животните за отрицателни контроли следва да бъде съгласуван с обхвата, предварително определен от лабораторията за всяка отделна тъкан и време на пробовземане за този животински вид (вж. точка 16). При липсата на предходни или публикувани данни за контроли, показващи, че избраният носител, броят на прилаганията или пътят на прилагане не предизвикват никакви неблагоприятни или генотоксични ефекти, следва да се извършат първоначални изследвания преди извършването на пълното изследване, за да се установи допустимостта на контролата на носител.

ПРОЦЕДУРА

Брой и пол на животните

Въпреки че има малко данни относно женски животни, от които да се направи сравнение между половете по отношение на кометното изследване, като цяло отклиците от други *in vivo* изпитвания за генотоксичност са сходни при мъжките и женските животни и поради това повечето изследвания могат да бъдат извършени с който и да е от двата пола. Данни, показващи относими разлики между мъжките и женските (например разлики в общата токсичност, метаболизма, бионаличността и т.н., включително например в изследване за определяне на обхвата) насърчават използването на двата пола. В този случай може да е уместно да се извърши проучване с двата пола, например като част от изследване за токсичност с повтарящи се дози. Ако се използват и двата пола, може да е уместно да се приложи факторен дизайн. Подробна информация за това как да се анализират данните с използването на посочения дизайн са дадени в допълнение 2.

Числеността на групите при започване на изследването (и по време на установяването на пригодността) следва да бъде определена с оглед предоставяне на минимум 5 анализируеми животни от група от един пол, или от всеки пол, ако са използвани и двата пола (по-малко в паралелната положителна контролна група — вж. точка 29). Когато експозицията на хора към химикали може да е специфична в зависимост от пола, като например при някои фармацевтични продукти, изпитването следва да се проведе с животни от подходящия пол. Като насока за типичните максимални изисквания за животни, едно проучване, проведено в съответствие с параметрите, установени в точка 33, с три групи на определена доза и паралелни отрицателни и положителни контролни групи (всяка група е съставена от пет животни от един и същ пол), ще изисква между 25 и 35 животни.

ГРАФИК НА ТРЕТИРАНЕ

Животните следва да бъдат третирани ежедневно за период от 2 или повече дни (т.е. две или повече третириания приблизително на 24-часови интервали), и следва да се вземат проби веднъж 2-6 часа (или в T_{max}) след последното третиране (12). Пробите от разширени режими на дозиране (напр. 28-дневно ежедневно дозиране) са приемливи. Доказано е успешното комбиниране на кометното изпитване и изпитването за микроядра в еритроцити (10) (19). Независимо от това следва внимателно да се разгледа въпросът за логистиката, свързана с вземане на тъканни проби за кометния анализ, наред с изискванията на вземане на тъканни проби за други видове токсикологична оценка. Събирането 24 часа след последната доза, което е типично при едно изследване за обща токсичност, не е целесъобразно в повечето случаи (вж. точка 40 относно времето на пробовземане). Използването на други графици на третиране и вземане на проби следва да бъде обосновано (вж. допълнение 3). Например единично третиране с многократно вземане на проби може да се използва, следва обаче да се отбележи, че ще бъдат изисквани повече животни за проучване с едно прилагане поради необходимостта от множество моменти на пробовземане, но понякога това може да бъде за предпочитане, например когато изпитваният химикал предизвиква прекомерна токсичност след повтаряни прилагания.

▼ M7

Независимо от начина, по който се извършва изпитването, то е приемливо, когато изпитваният химикал дава положителен отклик или, при изследване с отрицателен ефект, ако с преки или косвени доказателства е доказана експозиция на прицелната тъкан (тъкани) или токсичност за тази тъкан, или ако е достигната пределната доза (вж. точка 36).

Изпитваните химикали могат също да се прилагат като разделена доза, т.е. две третираня в един и същи ден, разделени от не повече от 2—3 часа, за да се улесни прилагането на голям обем. При тези обстоятелства, времето на вземане на проби трябва да се определи въз основа на датата на последното прилагане на доза (вж. точка 40).

Нива на доза

Ако се извършва предварително изследване за определяне на обхвата, поради това че към момента няма подходящи данни, които да са налични от други относими проучвания като помощно средство при избора на доза, то следва да се извърши в същата лаборатория, като се използва същият вид, порода, пол и режим на третиране, който се използва и в главното изследване съгласно настоящите подходи за извършване на изследвания за определяне на обхвата на дозите. Проучването следва да има за цел установяване на максималната допустима доза (МДД), определена като доза, предизвикваща слаби токсични ефекти в сравнение с продължителността на периода на изследването (например ясни клинични признаци като неестествено поведение или реакции, лека загуба на телесно тегло или цитотоксичност за прицелната тъкан), но не смърт или признаци на болка, страдание или дистрес, които изискват умъртвяване. За нетоксичен изпитван химикал с период на прилагане от 14 дни или повече максималната (пределна) доза е 1 000 mg/kg телесно тегло/ден. За период на прилагане от по-малко от 14 дни максималната (пределна) доза е 2 000 mg/kg телесно тегло/ден. За някои типове изпитвани химикали (напр. фармацевтични продукти за хуманна употреба), обхванати от специфично регулиране, тези граници могат да варират.

Химикалите, които показват насищане по отношение на токсикокинетични свойства, или предизвикват процеси на детоксикация, които могат да доведат до намаляване на експозицията след дългосрочно прилагане, могат да представляват изключения от критериите за определяне на дозата и следва да се оценяват за всеки отделен случай.

В допълнение към максималната доза (МДД, максимално възможна доза, максимална експозиция или пределна доза) за всяко време на вземане на проби следва да бъдат избрани най-малко две допълнителни дози, на подходящо отстояние една от друга, в намаляваща последователност (за предпочитане разделени от 10), за да се докажат отклици, свързани с дозата както при острия, така и при субакутния вариант на кометното изследване. Нивата на доза обаче следва също така за предпочитане да обхващат от максималната до слаба токсичност или липса на токсичност. Когато токсичност за прицелната тъкан се наблюдава при всички изпитвани нива на доза, препоръчително е допълнително проучване при нетоксични дози (вж. точки 54-55). За проучванията, целящи по-подробно проучване на формата на кривата доза-отклик, може да се изисква допълнителна група (групи) на определена доза.

Прилагане на дозите

При планирането на изследването следва да бъде взет предвид очакваният път на експозиция на човека. Поради това като обосновани могат да бъдат избрани например пътища на експозиция като хранителен режим, питейна вода, локално подкожно, орално (през сонда), вдишване, интратрахеално или имплантация. Във всички случаи пътят следва да се избере така, че да осигури достатъчна експозиция на прицелната тъкан (или тъкани). Интраперитонеалното инжектиране обикновено не се препоръчва, тъй като то не е типичен относим път на експозиция на човека, и следва да бъде използвано само със специална обосновка (напр. някои вещества за положителни контроли, за целите на проучване, или за някои лекарства, които се прилагат по интраперитонеален път). Максималният обем течност, който може да се приложи еднократно със сонда или инжекция, зависи от големината на изпитваното животно. Обемът не следва да превишава 1 ml/100 g телесно тегло, освен в случаите, когато се прилагат водни разтвори, когато обемът може да достигне 2 ml/100 g телесно тегло.

▼ M7

Обеми, по-високи от този (ако това е позволено от законодателството за хуманно отношение към животните), следва да се обосноват. Винаги, когато е възможно, следва да се постигат различни нива на доза чрез регулиране на концентрацията на формулировката за дозиране, за да се осигури постоянен обем във връзка с телесното тегло на всички нива на доза.

Момент на пробовземане

Моментът на пробовземане е критична променлива, защото се определя от периода, който е необходим изпитваните химикали да достигнат максимална концентрация в прицелната тъкан и да бъдат предизвикани скъсванията във веригата на ДНК, но преди тези скъсвания да бъдат отстранени, поправени или преди да доведат до смърт на клетките. Устойчивостта на някои увреждания, които водят до скъсвания във веригата на ДНК, откривани от кометното изследване, може да бъде много кратка, поне за някои химикали, изпитвани *in vitro* (52) (53). Съответно, ако има съмнения за такива преходни ДНК, следва да се вземат мерки за смекчаване на тези загуби, като се гарантира, че тъканите се събират достатъчно рано, евентуално по-рано от моментите по подразбиране, посочени по-долу. Оптималният момент (моменти) на вземане на проби може да бъде специфичен за химикала или за пътя, което води например до бърза експозиция на тъкан с интравенозно прилагане или експозиция при вдишване. Съответно, при наличие, моментите на вземане на проби следва да бъдат определени въз основа на данни за кинетиката (напр. времето (T_{max}) на достигане на пикова концентрация в плазмата или в тъканта (C_{max}), или в стационарно състояние при множество прилагания). При липса на данни за кинетиката подходящ компромис за измерване на генотоксичността е да се вземат проби от 2 до 6 часа след последното третиране за две или повече третириания, или както в периода 2-6 часа, така и 16-26 часа след еднократно прилагане, въпреки че следва да се положат грижи за аутопсия на всички животни в същия момент след последната (или единствената) доза. Информацията относно появата на токсични ефекти в целеви органи (ако е налична) също може да бъде използвана за избор на подходящи моменти на вземане на проби.

Наблюдения

Общи клинични наблюдения, свързани със здравето на животните, следва да бъдат извършвани и записвани поне един път дневно, за предпочитане по едно и също време всеки ден и като се има предвид пиковият период за поява на очакваните ефекти след дозиране (54). Поне два пъти дневно всички животни следва да се наблюдават за заболяемост и смъртност. При по-дългосрочни изследвания всички животни трябва да бъдат претегляни поне веднъж седмично, както и при завършване на периода на изпитването. Консумацията на храна трябва да се измерва при всяка смяна на храни и поне веднъж седмично. Ако изпитваният химикал се прилага чрез водата за пиене, консумацията на вода следва да се измерва при всяка смяна на водата и най-малко един път в седмицата. Животни, проявяващи нелетални признаци на прекомерна токсичност, следва да бъдат умъртвени преди приключването на периода на изпитване, и като цяло не се използват за кометен анализ.

Събиране на тъкани

Тъй като е възможно предизвикването на скъсвания във веригата на ДНК (комети) да бъде изследвано в почти всяка тъкан, обосновката на избора на тъкан (тъкани), която трябва да бъде събрана, следва да бъде ясно определена и да се основава на причината за провеждането на изследването и на всички съществуващи данни за АРМЕ, генотоксичност, канцерогенност или други данни за токсичност на проучвания химикал. Важни фактори за разглеждане следва да включват пътя на прилагане (въз основа на вероятния път или пътища на експозиция на човека), прогнозираните разпределение в тъканите и абсорбция, ролята на метаболизма както и възможния механизъм на действие на изпитваните химикали. Черният дроб е тъканта, която е най-често изследвана и за която има най-много данни. Следователно, при липсата на каквато и да било съпътстваща информация и ако не са идентифицирани специфични тъкани, представляващи интерес, вземането на проба от черния дроб би било обосновано, тъй като това е първоначалното място за метаболизма на ксенобиотици и често е силно експониран както на

▼ **M7**

базовото вещество (вещества), така и на метаболита (метаболитите). В някои случаи проверка на място на пряк контакт (например за химикали, прилагани орално, жлезистият стомах или дванадесетопръстникът/празното черво, или за инхалирани химикали — белият дроб) може да е относима в най-голяма степен. Допълнителни или алтернативни тъкани следва да бъдат подбрани въз основа на специфичните причини за провежданото изпитване, но може да се окаже полезно да се разгледат множество тъкани в същите животни, при условие че лабораторията е доказала пригодността си по отношение на тези тъкани и компетентността си при едновременно боравене с множество тъкани.

Приготвяне на образците

За процедурите, описани в следващите точки (44-49) е важно всички разтвори или стабилни суспензии да се използват до датата на изтичане на срока им на годност, или трябва да са пряко приготвени, ако е необходимо. Също така в следващите точки периодите от време, необходими за i) отстраняване на всяка тъкан след аутопсията, ii) обработване на всяка тъкан в суспензия от клетки/ядра и iii) обработване на суспензията и приготвяне на предметните стъкла, се считат за критични променливи (вж. определенията в допълнение 1), и по време на установяването на метода и доказването на пригодността следва да са определени приемливи периоди от време за всяка от тези стъпки.

Животните се умъртвяват в съответствие с действащото законодателство за хуманно отношение към животните и принципите за 3-те „R“, в подходящ момент (моменти) от време след последното третиране с изпитван химикал. Избраната тъкан (тъкани) се отстранява, извършва се дисекция на тъканта и част от нея се събира за кометното изследване, като в същото време част от същата част от тъканта следва да бъде нарязана и поставена във формалдехиден разтвор или подходящ фиксатор за евентуален хистопатологичен анализ (вж. точка 55) в съответствие със стандартни методи (12). Тъканта за кометното изследване се поставя в смилещ буфер, изплаква се със студен смилещ буфер в достатъчна степен, за да се отстрани остатъчната кръв, и се съхранява в леден смилещ буфер до обработката. Може също да се извърши *in situ* перфузия, напр. за черен дроб, бъбреци.

Съществуват множество публикувани методи за изолиране на клетки/ядра. Те включват смилане на тъкани като черен дроб и бъбреци, натривка на мукозни повърхности в случая със стомашно-чревния тракт, хомогенизиране и ензимно разграждане. При изпитването за валидиране на JaCVAM са проучени само изолирани клетки и следователно по отношение на установяването на метода и с оглед на възможността за позоваване на данни от изпитването на JaCVAM, за доказване на пригодността се предпочитат изолирани клетки. Бе установено обаче, че няма съществени различия в резултата от изследването, независимо дали са използвани изолирани клетки или ядра (8). Също така различни методи за изолиране на клетки/ядра (например хомогенизиране, смилане, ензимно разграждане и филтруване през мрежа) дават сравними резултати (55). Следователно могат да се използват или изолирани клетки, или изолирани ядра. Лабораторията трябва да извърши задълбочена оценка и валидиране на тъканно-специфични методи за изолиране на единични клетки/ядра. Както е обсъдено в точка 40, устойчивостта на някои увреждания, които водят до скъсвания във веригата на ДНК, откривани от кометното изследване, може да бъде много кратка (52) (53). Следователно, независимо от избрания метод за приготвяне на суспензии от единични клетки/ядра, важно е тъканите да се обработят във възможно най-кратък срок след умъртвяването на животните и да се поставят в условия, които намаляват отстраняването на увреждания (напр. чрез поддържане на тъканта при ниска температура). Клетъчните суспензии следва да се поддържат леденостудени, докато се приготвят за използване, така че да бъдат доказани минимално вариране между пробите и подходящи отклици от положителните и отрицателните контроли.

▼ M7**ПРИГОТВЯНЕ НА ПРЕДМЕТНИТЕ СЪГЛА**

Приготвянето на предметните съгла следва да се извърши във възможно най-кратък срок след приготвянето на единичните клетки/ядра (в идеалния случай в рамките на един час), но температурата и времето между умъртвяването и приготвянето на предметното съгло следва да бъдат строго контролирани и валидирани съгласно условията на лабораторията. Обемът на клетъчната суспензия, добавен към агароза с ниска температура на топене (обикновено 0,5-1,0 %) за приготвяне на предметните съгла, следва да не води до намаляване на процента на агароза с ниска температура на топене до по-малко от 0,45 %. Оптималната гъстота на клетките се определя чрез системата за анализ на изображения, използвана за отчитане на кометите.

Лизиране

Условията на лизиране също представляват критична променлива и могат да повлияят на скъсванията на веригата, произтичащи от специфични видове модификации на ДНК (някои алкилирания на ДНК и адукти с бази). Поради това се препоръчва условията на лизиране да се поддържат възможно най-постоянни за всички предметни съгла в рамките на опита. След като бъдат приготвени, предметните съгла се потапят в охладен лизиращ разтвор в продължение на поне един час (или от предишната вечер) при около 2-8 °C и омекотена светлина, например жълта светлина (или на място, защитено от светлина), като се избягва излагането на бяла светлина, която може да съдържа UV компоненти. След този инкубационен период предметните съгла трябва да се изплакнат, за да се отстранят остатъчните детергенти и соли преди съглата за разплитане в алкална среда. Това може да се постигне чрез пречистена вода, буфер за неутрализиране или фосфатен буфер. Може да се използва също и буфер за електрофореза. Това би запазило алкалните условия в камерата за електрофореза.

Разплитане и електрофореза

Предметните съгла следва да се поставят на случаен принцип върху платформата на устройство за електрофореза с потопен гел, съдържаща достатъчно разтвор за електрофореза, така че повърхностите на предметните съгла да са напълно покрити (дълбочината на покриване следва също така да бъдат съгласувана от между различните серии). При друг тип устройства за електрофореза за кометното изследване, т.е. устройства с активно охлаждане, циркулиране и захранване за високо натоварване, пълното покриване с разтвор ще доведе до по-висок електрически ток при поддържане на постоянно напрежение. Следва да се използва балансиран план за поставяне на предметните съгла във ваната за електрофореза за смекчаване на ефектите от евентуални трендове или от граничен ефект във ваната и за свеждане до минимум на варирането между партидите, т.е. във всяка серия на електрофореза следва да има един и същ брой предметни съгла от всяко животно в проучването и следва да бъдат включени проби от различните групи на определена доза, отрицателните и положителните контроли. Предметните съгла следва да бъдат оставени за най-малко 20 минути за разплитането на ДНК, след което се подлагат на електрофореза в контролирани условия, при които ще се постигне максимална чувствителност и динамичен обхват на изследването (т.е. които ще доведат до приемливи нива на % ДНК в опашката за отрицателните и положителните контроли, които осигуряват максимална чувствителност). Нивото на миграция на ДНК е линейно свързано с продължителността на електрофорезата, както и с потенциала (V/cm). Въз основа на изпитването на JaCVAM това би могло да бъде 0,7 V/cm в продължение на най-малко 20 минути. Продължителността на електрофорезата се смята за критична променлива и времето за електрофорезата следва да се определи с оглед оптимизиране на динамичния обхват. По-дълго време за електрофореза (напр. 30 или 40 минути, за да се постигне максимална чувствителност) обикновено води до по-силни положителни отклици с познати мутагени. Независимо от това, времето на електрофорезата могат също така да доведат до прекомерна миграция в контролните проби. Във всеки опит напрежението следва да се поддържа постоянно, а варирането на другите параметри следва да е в тесен и определен обхват, например в изпитването на JaCVAM 0,7 V/cm при изходен ток от 300 mA. Дълбочината на буфера следва да бъде коригирана, за да се получат необходимите условия, и следва да се поддържа по време на целия опит. Токът в началото и в края на електрофорезата следва да бъде записан. Оптималните условия

▼ **M7**

трябва следователно да бъдат определени по време на първоначалното доказване на пригодност в съответната лаборатория по отношение на всяка проучвана тъкан. Стойността на температурата на разтвора за електрофореза по време на разплитането и на електрофорезата следва да се поддържа на ниско равнище, обикновено 2-10 °C (10). Температурата на разтвора за електрофореза в началото на разплитането, началото на електрофорезата и края на електрофорезата следва да се записва.

След приключването на електрофорезата предметните стъкла следва да се потопят/изплакнат в буфера за неутрализиране за най-малко 5 минути. Геловите могат да бъдат оцветявани и стойностите отчетени „в прясно състояние“ (напр. в рамките на 1-2 дни) или могат да бъдат дехидратирани за по-късно отчитане (напр. в рамките на 1-2 седмици след оцветяването) (56). Независимо от това, условията следва да бъдат валидирани по време на доказването на пригодността и данните за предходни периоди следва да се получат и съхранят поотделно за всяко от тези условия. В последния случай предметните стъкла трябва да бъдат дехидратирани чрез потапяне в чист етанол в продължение най-малко на 5 минути, да се оставят да се изсушат на въздух, след което да се съхранят при стайна температура или в контейнер в хладилник до отчитането.

Методи за измерване

Кометите следва да бъдат количествено отчетени чрез система за изцяло автоматичен или полуавтоматичен анализ на изображения. Предметните стъкла се оцветяват с подходящ флуоресцентен оцветител, напр. SYBR Gold, Green I, пропидиев йодид или етидиев бромид и измерванията се извършват при подходящо увеличение (напр. 200x) с микроскоп, оборудван за епифлуоресценция и с подходящи детектори, или цифров (напр. CCD) фотоапарат.

Клетките могат да бъдат класифицирани в три категории, както е описано в Атласа с изображения на комети (57), а именно такива, които могат да бъдат отчетени, такива, които не могат да бъдат отчетени и „фантомни“ (вж. точка 56 за допълнително обсъждане). Само клетки, които могат да бъдат отчетени (ясно определени глава и опашка без влияние от съседни клетки) следва да бъдат отчетени за % ДНК в опашката, за да се избегнат артефакти. Не е необходимо да се протоколира честотата на клетките, които не могат да бъдат отчетени. Честотата на „фантомните“ клетки следва да се определя въз основа на визуално отчитане (тъй като липсата на ясно дефинирана глава ще означава, че те не могат да бъдат лесно открити чрез анализ на изображения) на поне 150 клетки от проба (вж. точка 56 за допълнително обсъждане), и да се документира отделно.

Всички предметни стъкла за анализ, включително тези на положителните и отрицателните контроли, следва да се кодират независимо едно от друго и да се отчетат „сляпо“, така че отчитащият да не е запознат с условията на третирането. За всяка проба (на тъкан на животно) следва да бъдат анализирани най-малко 150 клетки (с изключение на фантомните — вж. точка 56). Отчитането на 150 клетки на едно животно в най-малко 5 животни на дадена доза (по-малко в паралелна положителна контрола — вж. точка 29) предоставя достатъчна статистическа мощност в съответствие с анализа на Smith *et al.*, 2008 (5). Ако се използват предметни стъкла, може да се извърши отчитане на 2 или 3 предметни стъкла за всяка проба, като се използват пет животни за група. Няколко области от предметното стъкло следва да бъдат наблюдавани при плътност, която гарантира, че няма припокриване на опашки. Отчитането по ръбовете на предметните стъкла трябва да се избягва.

Скъсванията във веригата на ДНК в кометното изследване могат да бъдат измерени чрез независими крайни точки като % ДНК в опашката, дължина на опашката и момент на опашката. Всичките три измервания могат да се направят, ако се използва подходяща система със софтуер за анализ на изображения. Независимо от това % ДНК в опашката (известен също като % интензитет на опашката) се препоръчва за оценка и тълкуване на резултатите (12) (40) (41) (42), и се определя от интензитета на ДНК фрагмента в опашката, изразен като процент от общата стойност на интензитета за клетката (13).

▼ **M7****Увреждане на тъканите и цитотоксичност**

Положителните резултати в кометния анализ може да не се дължат единствено на генотоксичност, а токсичността за прицелната тъкан може също така да доведе до увеличаване на ДНК миграцията (12) (41). Обратно, при известни генотоксини често се наблюдава слаба или умерена цитотоксичност (12), което показва, че чрез кометното изследване само по себе си не е възможно да се разграничи миграцията на ДНК, предизвикана от генотоксичност, от тази, предизвикана от цитотоксичност. Независимо от това, когато се наблюдава увеличение на миграцията на ДНК, се препоръчва проверка на един или повече показатели за цитотоксичност, тъй като това може да спомогне за тълкуването на резултатите. Увеличението на миграцията на ДНК при наличието на ясни доказателства за цитотоксичност следва да се тълкува предпазливо.

Предложени са много измерители за цитотоксичността, от които хистопатологичните изменения се смятат за относим измерител на токсичността за тъканите. Наблюдения като възпалението, клетъчната инфилтрация, апоптичните или некротичните изменения се свързват с увеличаване на ДНК миграцията, но независимо от това, както се вижда от изпитването за валидиране на JaCVAM (12), няма окончателен списък на хистопатологичните изменения, които да са винаги свързани с увеличение на ДНК миграцията. Измененията в измерители от областта на клиничната химия (напр. ALT, AST) могат също така да предоставят полезна информация за увреждането на тъканите и допълнителни показатели, като например активиране на каспазата, оцветяване за TUNEL, оцветяване с Анексин V и други могат също да бъдат взети предвид. Съществуват обаче ограничени публикувани данни, съгласно които последните са били използвани за *in vivo* изследвания и някои могат да бъдат по-малко надеждни от други.

Фантомните клетки (или hedgehog-клетки) са клетки с микроскопско изображение, състоящо се от малка или несъществуваща глава и големи дифузни опашки, и се считат за силно увредени клетки, въпреки че етиологията тези клетки е несигурна (вж. допълнение 3). Поради външния им вид измерванията на % ДНК в опашката чрез анализ на изображения са ненадеждни и следователно фантомните клетки следва да се оценяват поотделно. Получаването на фантомни клетки следва да се отбележи и протоколира, а всички увеличения, за които се смята, че са свързани с изпитвания химикал, следва да се проучват и тълкуват внимателно. Знанията на потенциалния начин на действие на изпитваните химикали могат да помогнат при такива съображения.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Обработка на резултатите**

Опитна единица е отделното животно и следователно както индивидуалните данни за животните, така и обобщените резултати следва да се представят в табличен вид. Поради йерархичния характер на данните се препоръчва да се определи медианната стойност на % ДНК в опашката за всяко предметно стъкло, и да се изчисли средното на медианните стойности за всяко животно (12). След това се определя средната стойност на средните за отделните животни, която да даде средна стойност за групата. Всички тези стойности следва да се включат в протокола. Могат да се използват алтернативни подходи (вж. точка 53), ако са научно и статистически обосновани. Статистически анализ може да се извърши, като се използват разнообразни подходи (58) (59) (60) (61). При избора на статистическите методи, които ще се използват, следва да се вземе предвид нуждата от трансформация (напр. \log или квадратен корен) на данните и/или добавяне на малко число (напр. 0,001) към всички (дори различни от нулеви) стойности, както е обсъдено в горните препратки, за да се смекчи въздействието на нулевите стойности за клетката. Подробности за анализа на третирането/взаимодействието между половете, когато се използват животни и от двата пола, и последващият анализ на данни, при които са установени или не са установени различия, са дадени в допълнение 2. Данните за токсичността и за клиничните признаци следва също да бъдат протоколирани.

Критерии за приемливост

Приемливостта на дадено изпитване се основава на следните критерии:

- a. Паралелната отрицателна контрола се счита за приемлива за допълване към базата данни на дадената лаборатория за отрицателните контроли за предходни периоди, както е описано в точка 16.

▼ M7

- б. Паралелните положителни контроли (вж. точка 29) трябва да предизвикват отклици, които са съвместими с генерираните в базата данни за положителните контроли за предходни периоди, и да генерират статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола.
- в. Анализирани са достатъчен брой клетки и дози (точки 52 и 36—38).
- г. Критериите за избор на най-високата доза са съвместими с описаните в точка 36.

Оценяване и тълкуване на резултатите

При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно положителен, ако:

- а. при най-малко една от изпитваните дози се наблюдава статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола,
- б. увеличението е свързано с дозата при оценка, извършена с подходящ трендов тест,
- в. някой от резултатите е извън разпределението на данните за отрицателните контроли от предходни периоди за даден вид, носител, път, тъкан и брой прилагания.

Ако всички тези критерии са изпълнени, се смята, че изпитваният химикал може да предизвика скъсвания във веригата на ДНК в тъканите, изследвани в тази система за изпитване. Ако са изпълнени само един или два от тези критерии, вж. точка 62.

При условие, че са изпълнени всички критерии за приемливост, изпитваният химикал се счита за ясно отрицателен, ако:

- а. в никоя от изпитваните концентрации не се наблюдава статистически значимо увеличение в сравнение с паралелната отрицателна контрола,
- б. няма увеличение, свързано с концентрацията, при оценка, извършена с подходящ трендов тест,
- в. всички резултати са в рамките на разпределението на данните за отрицателните контроли от предходни периоди за даден вид, носител, път, тъкан и брой прилагания.
- г. с преки или косвени доказателства е доказана експозиция на прицелната тъкан (тъкани) или токсичност за тази тъкан.

Тогава се смята, че изпитваният химикал може да предизвика скъсвания във веригата на ДНК в тъканите, изследвани в тази система за изпитване.

Няма изискване за потвърждаване на ясно положителен или ясно отрицателен отклик.

В случай че откликът не е нито ясно отрицателен, нито ясно положителен (т.е. не всички критерии, изброени в точки 59 и 60, са изпълнени), и с цел подпомагане на установяването на биологичната относимост на даден резултат, данните следва да се оценяват чрез експертна оценка и/или чрез допълнителни изследвания, ако е научно обосновано. Отчитането на допълнителни клетки (когато е уместно) или извършването на опит с повторение с възможност за използване на оптимизирани опитни условия (напр. интервал на разполагане на дозите, други пътища на прилагане, други моменти на пробовземане и други) може да се окажат от полза.

В редки случаи дори след допълнителни изследвания наборът от данни не позволява стигането до заключение за положителни или отрицателни резултати и следователно се заключава, че е неясен.

▼ **M7**

За оценяване на биологичната относимост на даден положителен или неясен резултат се изисква информация относно цитотоксичността в прицелната тъкан (вж. точки 54-55). Когато се наблюдава положителен или неясен резултат само при наличието на ясни признаци на цитотоксичност, за изследването следва да се заключи, че е неясно по отношение на генотоксичността, освен ако има достатъчно информация в подкрепа на окончателно заключение. В случай на изследване с отрицателен резултат, когато са налице признаци за токсичност във всички изпитвани дози, може да е препоръчително допълнително проучване при нетоксични дози.

Протокол от изпитването

Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал:

- източник, номер на партидата, при наличност;
- стабилност на изпитвания химикал, крайна дата за употреба или дата за повторен анализ, ако е известна.

Вещество с една съставка:

- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- химична идентификация, като наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, SMILES или InChI код, структурна формула, чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и др.

Вещество с повече съставки, UVCB и смеси:

- характеризирани, доколкото е възможно, от химическата идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Разтворител/носител:

- обосновка за избора на разтворител/носител;
- разтворимост и стабилност на изпитвания химикал в разтворител/носител, ако са известни;
- приготвяне на формулировките с дозите;
- аналитични определяния, свързани с формулировките (напр. устойчивост, хомогенност, номинални концентрации:

Изпитвани животни:

- използван вид/порода и обосновка за избора от научна и етична гледна точка;
- брой, възраст и пол на животните;
- източник, условия на отглеждане, хранителен режим, облагородяване на жизнената среда и т.н.;
- индивидуално тегло на животните в началото и в края на изпитването, в т.ч. обхват на телесното тегло, средни стойности и стандартно отклонение за всяка група;

Условия на изпитването:

- данни за положителните и отрицателните (носител/разтворител) контроли;

▼ M7

- резултати от изследването за установяване на обхвата (ако е проведено);
- обосновка за избора на нивото на доза;
- подробна информация за приготвянето на изпитвания химикал;
- подробна информация относно прилагането на изпитвания химикал;
- обосновка на пътя на прилагане;
- място на инжектирането (за подкожно и интравенозно проучвания);
- методи за пробоподготовка, при наличност хистопатологични анализи, особено за химикал, който дава положителен отклик в кометното изследване;
- обосновка на избора на тъкан;
- методи за проверка дали изпитваният химикал е достигнал до прицелната тъкан, или до общото кръвообращение, ако са получени отрицателни резултати;
- действителна доза (mg/kg телесно тегло дневно), изчислена от концентрацията на изпитвания химикал в хранителния режим/питейната вода (ppm), и консумация, ако е приложимо;
- подробности относно качество на хранителния режим и водата;
- подробно описание на графици на третиране и вземане на проби и обосновки за направения избор (напр. токсикокинетични данни, когато има такива);
- метод за облекчаване на болката, аналгезия;
- метод за умъртвяване;
- процедури за изолиране и съхраняване на тъкани;
- методи за приготвяне на суспензии от единични клетки/ядра;
- източник и номера на партии за всички реагенти (когато е възможно);
- методи за оценка на цитотоксичността;
- условия на електрофореза;
- техники за оцветяване; както и
- методи за отчитане и измерване на комети.

Резултати:

- Общи клинични наблюдения, ако има такива, преди и по време на периода на изпитване за всяко животно;
- доказателства за цитотоксичност, ако е извършвано изследване;

▼ M7

- за изследвания, по-дълги от една седмица: индивидуално телесно тегло на животните по време на изпитването, в т.ч. обхват на телесното тегло, средни стойности и стандартно отклонение за всяка група; консумация на храна;
- взаимоотношение доза-отклик, където е очевидно;
- За всяка тъкан/животно — % ДНК в опашката (или други измерители, ако са избрани) и медианни стойности за предметно стъкло, средни стойности за всяко животно и средни стойности за всяка група;
- данни за паралелни отрицателни контроли/отрицателни контроли от предходни периоди, с размах, средни/медианни стойности и стандартни отклонения за всяка оценена тъкан;
- данни за паралелни положителни контроли/положителни контроли от предходни периоди;
- за тъкани, различни от черен дроб, крива доза-отклик с използване на положителната контрола. Това може да бъде от данните, събрани по време на доказването на пригодността (вж. точки 16-17) и следва да се придружава от обосновка, с позовавания на актуална литература, за целесъобразността на големината и разсейването на отклиците на контролите в тази тъкан;
- статистически анализи и използвани методи; и критерии за считане на даден отклик за положителен, отрицателен или неясен;
- честота на фантомните клетки във всяка група и на животно.

Обсъждане на резултатите

Заклучение

Позовавания

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.
- (2) Brendler-Schwaab, S. *et al.* (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.
- (3) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- (4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.
- (5) Smith, C.C. *et al.* (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.
- (6) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.
- (7) McKelvey-Martin, V.J. *et al.* (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.
- (8) Tice, R.R. *et al.* (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.

▼ M7

- (9) Singh, N.P. *et al.* (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.
- (10) Rothfuss, A. *et al.* (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40-69.
- (11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- (13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the „Comet“ assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.
- (14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.
- (15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249-61.
- (16) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-20.
- (17) Kushwaha, S. *et al.* (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145–54.
- (18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.
- (19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.
- (20) Recio, L. *et al.* (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.
- (21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.
- (22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations**, *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.
- (23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.
- (24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175-8.

▼ M7

- (25) Toyozumi, T. *et al.* (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.
- (26) Struwe, M. *et al.* (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.
- (27) Wada, K. *et al.* (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.
- (28) Wang, A. *et al.* (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.
- (29) Burlinson, B. *et al.* (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- (30) Jackson, P. *et al.* (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.
- (31) Sasaki, Y.F. *et al.* (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.
- (32) Sekihashi, K. *et al.* (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53-74.
- (33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity**, *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3-12.
- (34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.
- (35) Cordelli, E. *et al.* (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.
- (36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.
- (37) Pfuhrer, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.
- (38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.
- (39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay**, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.

▼ M7

- (40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), pp. 7-16.
- (41) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, pp. 31-5.
- (42) Kumaravel, T.S. *et al.* (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.
- (43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.
- (44) Möller, P. *et al.* (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109-11.
- (45) Forchhammer, L. *et al.* (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.
- (46) Azqueta, A. *et al.* (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.
- (47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, John Wiley and Sons, New York 2nd ed.
- (49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)
- (50) Глава Б.8 от настоящото приложение: *Субакутна инхалаторна токсичност: 28-дневно изследване.*
- (51) Глава Б.29 от настоящото приложение: *Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study.*
- (52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.
- (53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41.
- (54) OECD (2002), „Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.
- (55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.
- (56) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45–51.
- (57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.
- (58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.

▼ M7

- (59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.
- (60) Bright, J. *et al.* (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.
- (61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.

▼ M7*Допълнение 1*

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Електрофореза на единични клетки в алкална среда: Чувствителна техника за откриване на първични увреждания на ДНК на равнището на отделната клетка/ядро.

Химикал: Вещество или смес.

Комета: Формата, която приемат нуклеоидите след подлагането им на въздействие на поле от електрофореза, поради нейното сходство с комета: главата е ядрото, а опашката е съставена от ДНК, мигрираща извън пределите на ядрото в електрическото поле.

Критична променлива/параметър: Това е променлива от прококол, при която малки изменения могат да имат голямо въздействие върху извода от изследването. Критичните променливи могат да бъдат специфични за дадена тъкан. Критичните променливи следва да не бъдат изменяни, особено в рамките на изпитването, без да се вземе предвид начинът, по който изменението ще доведе до изменение на отклика при изследване, определено например според големината и варирането му в положителните и отрицателните контроли. В протокола от изпитването следва да се изброят измененията на критичните променливи, направени по време на теста или в сравнение със стандартния протокол за лабораторията, и да се представи обосновка за всяко изменение.

Интензитет на опашката или % ДНК в опашката: Това съответства на интензивността на опашката на кометата спрямо общия интензитет (главата плюс опашката). Той отразява количеството скъсвания на ДНК, изразено като процент.

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

UVCB: Вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали.

▼ M7

Допълнение 2

**ФАКТОРНИЯТ ДИЗАЙН ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА РАЗЛИКИ
МЕЖДУ ПОЛОВЕТЕ ПРИ *IN VIVO* КОМЕТНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ****Факторният дизайн и неговият анализ**

При този дизайн се изпитват минимум 5 мъжки и 5 женски животни на всяко равнище на концентрация, в резултат от което в дизайна се използват най-малко 40 животни (20 мъжки и 20 женски животни, плюс относимите положителни контроли).

Дизайнът, който е един от по-простите видове факторен дизайн, е равностоеен на двуфакторния дисперсионен анализ, с пола и равнището на концентрация като главни ефекти. Данните могат да бъдат анализирани с помощта на множество стандартни статистически софтуерни пакети като например SPSS, SAS, STATA, Genstat, както и с използване на R.

Анализът разпределя варирането в набора от данни като вариране между полове, вариране между концентрациите и вариране, свързано с взаимодействието между полове и концентрациите. Всеки от компонентите се тества спрямо оценка на варирането между животните, представляващи повторения в рамките на групите животни от един и същ пол, които са на една и съща концентрация. Пълни подробности за използваната методика са на разположение в множество стандартни статистически учебници (вж. позоваванията) и в помощните текстове, предоставени със статистическите пакети.

Анализът продължава с проверка на компонента за взаимодействие пол \times концентрация в ANOVA таблицата ⁽¹⁾. При липсата на значим компонент за взаимодействие комбинирани стойности за полове или за равнищата на концентрация предоставят валидни статистически тестове между равнищата, въз основа на компонента за обединеното вътрешногрупово вариране на ANOVA.

Анализът продължава като се раздели оценката на варирането между концентрациите на контрасти, които дават възможност за тест за линейни и квадратични контрасти на отклиците за равнищата на концентрация. Когато е налице значимо взаимодействие пол \times концентрация, този компонент също може да се подраздели на контрасти за линейно \times пол и квадратично \times пол взаимодействие. Тези компоненти предоставят възможност за тестове дали концентрационните отклици са успоредни за двата пола, или има диференциален отклик между двата пола.

Оценката на обединеното вътрешногрупово вариране може да се използва за предоставяне на възможност за тестове за сравнения по двойки на разликата между средните стойности. Тези сравнения могат да се правят между средните стойности за двата пола и между средните стойности за различното равнище на концентрация, като за сравнения с равнищата за отрицателните контроли. В случаите, когато е налице значимо взаимодействие, могат да се направят сравнения между средните стойности за различни концентрации в рамките на даден пол, или между средните стойности за полове при една и съща концентрация.

Позовавания

Съществуват много статистически учебници, в които се разглеждат теорията, планирането, методологията, анализа и тълкуването на факторните дизайни, вариращи от най-простите двуфакторни анализи до по-сложните форми, използвани в методологията за планиране на опити. По-долу е представен неизчерпателен списък. Някои книги предоставят практически примери за сравними модели, в някои случаи с код за провеждането на анализите с използване на различни софтуерни пакети.

⁽¹⁾ Статистиците, които използват подход за моделиране, като например обобщени линейни модели (GLM), може да подхождат към анализа по различен, но сравним начин, но не получават непременно традиционната ANOVA таблица, която датира от алгоритмичните подходи за изчисляване на статистически данни, разработени в епохата преди появата на компютрите.

▼M7

- (1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.
- (2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.
- (3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.
- (4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.
- (5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.
- (6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.
- (7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

НАСТОЯЩИ ОГРАНИЧЕНИЯ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Поради настоящото състояние на познанията, с *in vivo* кометното изследване са свързани няколко ограничения. Очаква се, че тези ограничения ще бъдат намалени или по-точно определени, тъй като вече има повече натрупан опит с прилагането на изследването за отговор на въпроси, свързани с безопасността в нормативен контекст.

1. Някои видове увреждане на ДНК могат да се окажат краткотрайни, т.е. могат да бъдат поправени твърде бързо, за да бъдат наблюдавани 24 или повече часа след последната доза. Няма установим списък с типовете кратковременни увреждания, нито на химикалите, които е вероятно да причиняват този тип увреждания, нито е известно в какъв период от време могат да бъдат открити този тип увреждания. Оптималният момент (моменти) на вземане на проби също може да бъде специфичен за химикала или за пътя, а моментите на вземане на проби следва да бъдат определени с оглед на кинетичните данни (напр. времето T_{max} на достигане на пикова концентрация в плазмата или в тъканта), когато такива данни са налични. По-голямата част от изследванията за валидиране в подкрепа на настоящия метод за изпитване определят аутопсия 2 или 3 часа след прилагане на последната доза. Повечето изследвания в публикуваната литература описват прилагане на последната доза между 2 и 6 часа преди умъртвяването. Поради това тези опити са били използвани като основа за препоръката в рамките на метода за изпитване, че при отсъствието на данни, показващи противното — последната доза следва да бъде приложена в определена времева точка между 2 и 6 часа преди аутопсията.
2. Няма установими данни от проучвания, които разглеждат чувствителността на изпитването за откриване на краткотрайни увреждания на ДНК след прилагане чрез храна или питейна вода, в сравнение с прилагане чрез хранене през сонда. Увреждане на ДНК е открито след прилагане чрез фуражи и питейна вода, но съществуват малко такива протоколи, в сравнение с много по-големия опит със сонди и интраперитонеално прилагане. По този начин чувствителността на изследването може да бъде намалена за химикали, които предизвикват краткотрайни увреждания след прилагане чрез фуражи или питейна вода.
3. Не са извършвани междублабораторни изследвания в тъкани, различни от черен дроб и стомах, и следователно не е установена препоръка за това как да се постигне чувствителен и възпроизводим отклик в тъкани, различни от черен дроб, като например очакван размах при положителни и отрицателни контроли. За черния дроб също така не е постигнато съгласие за определяне на по-ниска долна граница за стойността за отрицателната контрола.
4. Макар че има няколко публикации, доказващи невъзможността за разграничаване при цитотоксичността *in vitro*, много малко данни са били публикувани *in vivo* и поради това не може да се препоръча нито един измерител на цитотоксичността. Хистопатологични изменения като възпалението, клетъчната инфилтрация, апоптичните или некротичните изменения се свързват с увеличаване на миграцията на ДНК, но независимо от това, както се вижда от изпитването за валидиране на JaCVAM (OECD, 2014), тези изменения не винаги водят до положителни резултати при кометното изследване и следователно няма окончателен списък на хистопатологичните изменения, които да са винаги свързани с увеличение на миграцията на ДНК. Фантомните клетки (hedgehogs или clouds, ghost cells) първоначално са били предложени като показател за цитотоксичност, но етиологията на тези клетки е несигурна. Съществуват данни, които предполагат, че е възможно те да са предизвикани от свързана с химикал цитотоксичност, механично/ензимно предизвикано увреждане, инициирано по време на пробоподготовката (Guerard *et al.*, 2014) и/или по-екстремален ефект на генотоксичност от изпитвания химикал. Други данни изглежда сочат, че те се дължат на значителни увреждания на ДНК, които обаче по всяка вероятност могат да бъдат поправени (Lorenzo *et al.*, 2013).

▼ M7

5. Тъкани или клетъчни ядра са били успешно замразени за по-късен анализ. Това обикновено води до измеримо въздействие върху отклика на контролата на носител и положителната контрола (Recio *et al.*, 2010; Recio *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2013). Ако се използват, лабораторията следва да докаже компетентност по отношение на методологии замразяване и да потвърди приемлив нисък размах за % ДНК в опашката в прицелни тъкани на животни, третирани с носител, както и че все още могат да бъдат открити положителни отклици. В литературата замразяването на тъканите се описва с използване на различни методи. Понастоящем обаче не съществува съгласие относно най-добрите начини за замразяване и размразяване на тъкани, и как да се прецени дали даден потенциално изменен отклик може да окаже влияние върху чувствителността на изпитването.
6. Неотдавнашни изследвания доказват, че се очаква списъкът с критичните променливи да продължи да се скъсява, а параметрите за критичните променливи да се дефинират по-точно (Guerard *et al.*, 2014).

Позовавания

- (1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.
- (2) Jackson, P. *et al.* (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.
- (3) Lorenzo, Y. *et al.* (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.
- (4) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- (5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.
- (6) Recio, L. *et al.* (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.

▼B**Част В: МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕТО НА ЕКОЛОГИЧНА ТОКСИЧНОСТ**

СЪДЪРЖАНИЕ

- V.1. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ ЗА РИБА
- V.2. *DAPHNIA* SP. ИЗПИТВАНЕ ЗА ОСТРА ИМОБИЛИЗАЦИЯ
- V.3. СЛАДКОВОДНИ ВОДОРАСЛИ И ЦИАНОБАКТЕРИИ, ИЗПИТВАНЕ ЗА ПОТИСКАНЕ НА РАСТЕЖА
- V.4. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПРЯКАТА БИОЛОГИЧНА РАЗГРАДИМОСТ
- ЧАСТ I. ОБЩИ СЪОБРАЖЕНИЯ
- ЧАСТ II. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА DOS ЧРЕЗ СКОРОСТТА НА ОТМИРАНЕ (МЕТОД В.4-А)
- ЧАСТ III. МОДИФИЦИРАН СКРИНИНГ НА ОИСП (МЕТОД В.4-Б)
- ЧАСТ IV. МЕТОД ЗА ОТДЕЛЯНЕ НА CO₂ (МЕТОД В.4-В)
- ЧАСТ V. ИЗПИТВАНЕ ЧРЕЗ МАНОМЕТРИЧНА РЕСПИРОМЕТРИЯ (МЕТОД В.4-Г)
- ЧАСТ VI. ИЗПИТВАНЕ ПО МЕТОДА НА ИЗОЛИРАНИТЕ ПРОБИ (МЕТОД В.4-Д)
- ЧАСТ VII. ИЗПИТВАНЕ ПО М.І.Т.І. (МЕТОД В.4-Е)
- V.5. РАЗГРАЖДАНЕ – БИОХИМИЧНА ПОТРЕБНОСТ ОТ КИСЛОРОД
- V.6. РАЗГРАЖДАНЕ – ХИМИЧНА ПОТРЕБНОСТ ОТ КИСЛОРОД
- V.7. РАЗГРАЖДАНЕ – АБИОТИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ: ХИДРОЛИЗА КАТО ФУНКЦИЯ ОТ PH
- V.8. ТОКСИЧНОСТ ЗА ЗЕМНИ ЧЕРВЕИ.
- V.9. БИОЛОГИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ – ИЗПИТВАНЕ С ИЗКУСТВЕНА ПОЧВА
- V.10. ИЗПИТВАНЕ ЗА СИМУЛИРАНЕ НА АЕРОБНО ПРЕЧИСТВАНЕ НА ОТПАДЪЧНИ ВОДИ: В.10-А: МОДУЛИ С АКТИВНА УТАЙКА — В.10-Б: БИОФИЛМИ
- V.11. ИЗПИТВАНЕ ЗА ПОТИСКАНЕ ДИШАНЕТО НА АКТИВНА УТАЙКА (ОКИСЛЯВАНЕ НА ВЪГЛЕРОД И АМОНИЕВИ ЙОНИ)
- V.12. БИОЛОГИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ – МОДИФИЦИРАНО SCAS ИЗПИТВАНЕ
- V.13. БИОАКУМУЛАЦИЯ В РИБИ: ЕКСПОЗИЦИЯ ПО ВОДЕН ПЪТ И ЧРЕЗ ХРАНИТЕЛНИЯ РЕЖИМ
- V.14. ТЕСТВАНЕ РАСТЕЖА НА МЛАДИТЕ РИБИ
- V.15. РИБИ, КРАТКОСРОЧЕН ТЕСТ ЗА ТОКСИЧНОСТ ПРИ ЕМБРИОНИТЕ И ИНДИВИДИТЕ В СТАДИЙ НА ХРАНЕНО ОТ ЖЪЛТЪЧНАТА ТОРБИЧКА
- V.16. МЕДОНОСНА ПЧЕЛА – ТЕСТ ЗА ОСТРА ОРАЛНА ТОКСИЧНОСТ
- V.17. МЕДОНОСНА ПЧЕЛА – ТЕСТ ЗА ОСТРА КОНТАКТНА ТОКСИЧНОСТ
- V.18. АДСОРБЦИЯ/ДЕСОРБЦИЯ ЧРЕЗ ИЗПОЛЗВАНЕ МЕТОДА ЗА РАВНОВЕСИЕ В ГРУПАТА

▼B

- V.19. ИЗЧИСЛЯВАНЕ КОЕФИЦИЕНТА НА АДСОРБЦИЯ (K_{oc}) НА ПОЧВАТА И НА УТАЙКАТА ОТ ОТПАДНИ ВОДИ, ИЗПОЛЗВАЩИ ВИСОКОЕФЕКТИВНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ (HPLC)
- V.20. ИЗПИТВАНЕ ЗА РАЗМНОЖАВАНЕ НА *DAPHNIA MAGNA*
- V.21. ПОЧВЕНИ МИКРООРГАНИЗМИ: ИЗПИТВАНЕ НА АЗОТНАТА ТРАНСФОРМАЦИЯ
- V.22. ПОЧВЕНИ МИКРООРГАНИЗМИ: ИЗПИТВАНЕ НА ВЪГЛЕРОДНАТА ТРАНСФОРМАЦИЯ
- V.23. АЕРОБНА И АНАЕРОБНА ТРАНСФОРМАЦИЯ В ПОЧВИ
- V.24. АЕРОБНА И АНАЕРОБНА ТРАНСФОРМАЦИЯ ВЪВ ВОДНИ СЕДИМЕНТНИ СИСТЕМИ
- V.25. АЕРОБНА МИНЕРАЛИЗАЦИЯ В ПОВЪРХНОСТНИ ВОДИ — СИМУЛАЦИОННО ИЗПИТВАНЕ ЗА БИОРАЗГРАЖДАНЕ
- V.26. ИЗПИТВАНЕ НА ПОТИСКАНЕТО НА РАСТЕЖА НА ВИДОВЕ ОТ РОД *LEMNA*
- V.27. ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ЗА ХИРОНОМИДИ В СИСТЕМА ВОДА–СЕДИМЕНТ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА СЕДИМЕНТ С ДОБАВКА
- V.28. ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ЗА ХИРОНОМИДИ В СИСТЕМА ВОДА–СЕДИМЕНТ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА ВОДА С ДОБАВКА
- V.29. ЛЕСНА БИОРАЗГРАДИМОСТ — CO_2 В ЗАПЕЧАТАНИ СЪДОВЕ (ИЗПИТВАНЕ В СВОБОДНОТО ПРОСТРАНСТВО НАД ТЕЧНОСТТА)
- V.30. БИОАКУМУЛАЦИЯ В СУХОЗЕМНИ ОЛИГОХЕТИ
- V.31. ИЗПИТВАНЕ НА СУХОЗЕМНИ РАСТЕНИЯ: ИЗПИТВАНЕ ЗА ПОНИКВАНЕ И РАСТЕЖ НА ПОНИЦИ
- V.32. ИЗПИТВАНЕ ЗА РАЗМНОЖАВАНЕ НА ПРЕДСТАВИТЕЛИ НА СЕМ. ENCHYTRAEDIAE
- V.33. ИЗПИТВАНЕ ЗА РАЗМНОЖАВАНЕ НА ЗЕМНИ ЧЕРВЕИ (*EISENIA FETIDA*/ *EISENIA ANDREI*)
- V.34. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ИНХИБИРАНЕТО НА АКТИВНОСТТА НА АНАЕРОБНИ БАКТЕРИИ — НАМАЛЯВАНЕ НА ПРОИЗВОДСТВОТО НА ГАЗ ОТ АНАЕРОБНО РАЗГРАЖДАЩИ СЕ (ОТПАДЪЧНИ) УТАЙКИ
- V.35. ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ЗА ВИДОВЕ ОТ РОД *LUMBRICULUS* С ИЗПОЛЗВАНЕ НА СЕДИМЕНТ С ДОБАВКА В СИСТЕМА СЕДИМЕНТ-ВОДА
- V.36. ИЗПИТВАНЕ ЗА РАЗМНОЖАВАНЕ НА ХИЩЕН АКАР (*HYPOASPIS (GEOLAEELAPS) ACULEIFER*) В ПОЧВАТА
- V.37. 21-ДНЕВНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА РИБИ: КРАТКОСРОЧЕН СКРИНИНГ ЗА ЕСТРОГЕННА АКТИВНОСТ, АНДРОГЕННА АКТИВНОСТ И ПОТИСКАНЕ НА АРОМАТАЗАТА
- V.38. ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА МЕТАМОРФОЗА НА ЗЕМНОВОДНИ
- V.39. ИЗПИТВАНЕ ЗА РАЗМНОЖАВАНЕ НА КОЛЕМБОЛИ В ПОЧВАТА

▼B

- V.40. ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ПРЕЗ ЦЕЛИЯ ЖИЗНЕН ЦИКЪЛ НА ХИРОНОМИДИ В СИСТЕМА ВОДА-СЕДИМЕНТ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА ВОДА С ДОБАВКА ИЛИ СЕДИМЕНТ С ДОБАВКА
- V.41. ИЗПИТВАНЕ ЗА РАЗВИТИЕ НА ПОЛА ПРИ РИБИТЕ
- V.42. БИОРАЗГРАДИМОСТ В МОРСКА ВОДА
- V.43. АНАЕРОБНА БИОРАЗГРАДИМОСТ НА ОРГАНИЧНИ ВЕЩЕСТВА В РАЗГРАДЕНА УТАЙКА: ЧРЕЗ ИЗМЕРВАНЕ НА ПОЛУЧАВАНЕТО НА ГАЗ
- V.44. ПРОСМУКВАНЕ В ПОЧВЕНИ КОЛОНИ
- V.45. ОЦЕНКА НА ЕМИСИИТЕ В ОКОЛНАТА СРЕДА ОТ ДЪРВЕСИНА, ТРЕТИРАНА С КОНСЕРВАНТИ: ЛАБОРАТОРЕН МЕТОД ЗА СТОКИ ОТ ДЪРВЕСИНА, КОИТО НЕ СА ПОКРИТИ И СА В КОНТАКТ СЪС СЛАДКА ИЛИ МОРСКА ВОДА
- V.46. БИОАКУМУЛАЦИЯ В БЕНТОСНИ ОЛИГОХЕТИ, ОБИТАВАЩИ СЕДИМЕНТИ
- V.47. РИБИ, ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ НА РАННИ СТАДИИ ОТ ЖИЗНЕНИЯ ЦИКЪЛ
- V.48. КРАТКОСРОЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО ПРИ РИБИ
- V.49. ИЗПИТВАНЕ ЗА ОСТРА ТОКСИЧНОСТ ПРИ РИБНИ ЕМБРИОНИ (ТРЕ)
- V.50. ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ БЕЗ СЕДИМЕНТИ ПРИ *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*
- V.51. ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ В СИСТЕМА ВОДА-СЕДИМЕНТ ПРИ *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*

▼B**В.1. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ ЗА РИБА****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Целта на този тест е да определи острата летална токсичност на вещество за риба в прясна вода. Желателно е да се разполага, доколкото е възможно, с данни за разтворимостта във вода, парното налягане, химическата устойчивост, дисоциационните константи и биологичното разграждане на веществото, за да се улесни изборът на най-подходящия метод за тестване (статичен, полустатичен или с постоянно водоподаване) с оглед осигуряването на достатъчно постоянни концентрации на изследваното вещество при провеждане на теста.

Допълнителната информация (например структурна формула, степен на пречистеност, естество и процентно съдържание на значими примеси, наличие и количества на добавки и разделителен коефициент n -octanol/вода) следва да се взема предвид както при подготовката на теста, така при интерпретацията на резултатите.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Остра токсичност е видимото вредно въздействие, причинено в организъм при излагане за кратко време (дни) на въздействие на вещество. В настоящия тест острата токсичност е изразена като средна летална концентрация (LC_{50}), това е концентрацията във вода, която умъртвява 50 % от опитното количество риба при непрекъснато излагане и която следва да бъде посочена.

Всички концентрации на тестваното вещество са посочени в тегло за обем (милиграми на литър). Те могат да бъдат изразени също и в тегло за тегло ($mg \cdot kg^{-1}$).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Референтното вещество може да се тества като средство за доказване, че в условията на лабораторен опит реакциите на изследваните видове не се променят съществено.

За този тест не се посочват вещества за сравнение.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Може да се извърши ограничен тест със 100 mg/l, за да се докаже, че LC_{50} е по-голяма от тази концентрация.

Рибите се излагат на тестваното вещество, добавяно във водата в определен обхват от концентрации в продължение на 96 часа. Умъртвените бройки се отчитат на интервали от поне 24 часа и на всеки наблюдаван интервал, където е възможно, се изчисляват концентрациите, умъртвили 50 % от рибите (LC_{50}).

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Критериите за качество се прилагат както към ограничения тест, така и към пълния метод на изследване.

Смъртността при контролните риби не следва да надвишава 10 % (или не повече от 1 риба, ако са използвани по-малко от 10 бройки) до края на експеримента.

Концентрацията на разтворения кислород следва да бъде над 60 % от стойността на въздухонаситеността на водата по време на теста.

▼B

Концентрациите на тестваното вещество следва да се поддържат в рамките до 80 % от първоначалните концентрации в продължение на целия експеримент.

За вещества, които лесно се разтварят в опитната среда, получавайки по този начин стабилни разтвори, т.е. такива, които няма, в известен значителен размер, да се изпарят, разложат, хидролизират или адсорбират, първоначалната концентрация може да бъде приета за равна на номиналната концентрация. Следва да се представят доказателства, че през периода на теста концентрациите са били поддържани постоянни и че критериите за качество са били спазени.

За вещества, които са:

- i) слабо разтворими в опитната среда, или
- ii) способни да образуват стабилни емулсии или дисперсии, или
- iii) нестабилни във водни разтвори,

като първоначална концентрация се приема измерената концентрация в разтвора (или, ако е технически невъзможно, във водна колона) в началото на теста. Концентрацията се определя след период на равновесие, но преди въвеждането на опитната риба.

Във всеки от тези случаи следва да се извършва последващо измерване, за да се потвърдят конкретните концентрации на излагане или изпълнението на качествените критерии.

pH не следва да варира с повече от 1 единица.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Могат да се използват 3 вида процедури:

Статичен тест:

Това е тест за токсичност, при който не се добавя от опитния разтвор. (Разтворите остават непроменени през целия период на теста.)

Полустатичен тест:

Това е тест без добавяне от опитния разтвор, но при равномерно подновяване на целия опитен разтвор след продължителни периоди от време (например 24 часа).

Постоянно водоподаване:

Това е тест за токсичност, при който водата се обновява постоянно в опитните камери, а химическото вещество, което се изследва, се пренася с използваната вода за подновяване на опитната среда.

1.6.1. Химически реактиви

1.6.1.1. Разтвори на опитните вещества

Стандартни разтвори с необходимата сила се приготвят чрез разтваряне на веществото в дейонизирана вода или във вода съгласно описанието в т. 1.6.1.2.

Избраните опитни концентрации се приготвят чрез разреждане на стандартния разтвор. Ако се тестват високи концентрации, веществото може да бъде разтворено директно във водата.

▼B

Обикновено веществата се изследват само до границата на разтворимост. За някои вещества (например вещества с ниска разтворимост във вода, или висок P_{ow} , или тези, които образуват по-скоро стабилна дисперсия, отколкото истински разтвор във вода) се допуска опитната концентрация да бъде над границата на разтворимост за веществото, за да се гарантира, че е получено максималното съотношение между разтворимост и стабилна концентрация. Важно е обаче тази концентрация по никакъв начин да не нарушава опитната система (например появата на филм на водната повърхност, пречейки за окисляването на водата, и т.н.).

Ултразвукова дисперсия, органични разтворители, емулгатори или дисперсанти могат да се използват като помощни съединения за приготвяне на стандартни разтвори на вещества с ниска водоразтворимост или да спомагат за разпръскването на тези вещества в опитната среда. Когато се използват такива спомагателни вещества, всички опитни концентрации следва да съдържат еднакво количество от спомагателните вещества и допълнителните бройки контролна риба да бъдат изложени на същата концентрация от спомагателното вещество, каквато се използва в опитните серии. Концентрацията на такива помощни съединения следва да бъде сведена до минимум, но в никакъв случай не следва да надвишава 100 mg/l в опитната среда.

Тестът се провежда без регулиране на рН. Ако се появят симптоми за настъпили промени в рН, препоръчва се тестът да бъде повторен с регулиране на рН и резултатите да се отбележат. В този случай стойността на рН на стандартния разтвор следва да се нагласи към стойността на рН на водата за разреждане, освен ако няма специфични причини това да не се направи. Предпочитани за целта са HCl и NaOH. Това регулиране на рН следва да се извърши така, че концентрацията на опитното вещество в стандартния разтвор да не се промени в значителна степен. Ако в резултат от регулацията на рН настъпи някаква химическа реакция или при опитното вещество протече физическо утаяване, това също следва да се отбележи.

1.6.1.2. *Съхранение и разреждане на водата*

Може да се използва питейна вода от водопровода (незамърсена от потенциално вредните концентрации на хлор, тежки метали или други вещества), доброкачествена природна вода или пречистена/дестилирана вода (вж. допълнение 1). Предпочитат се води с обща твърдост между 10 и 250 mg/l (като CaCO₃) и с рН от 6,0 до 8,5.

1.6.2. **Апаратура**

Всички уреди следва да бъдат изработени от химически инертен материал.

— автоматична система за разреждане (за теста с постоянно водоподаване);

— измервател на кислород;

— уред за определяне твърдостта на водата;

— подходяща апаратура за температурен контрол;

— рН-метър.

1.6.3. **Опитна риба**

Рибите следва да са в добро здраве и да нямат никакви малформации.

▼B

Използаните видове следва да се подбират въз основа на практически критерии, каквито са постоянно наличие в течение на годината, лесно отглеждане, подходящи (удобни) за тестване, относителна чувствителност към химикали, както и към всякакви икономически, биологически или екологични фактори, които съществуват. Необходимостта от сравняемост на получените данни и съществуващата международна хармонизация (препратка 1) следва също да бъдат взети предвид при избора на вида риба.

Списък на видовете риба, които са препоръчителни за изпълнението на този тест, е представен в допълнение 2; най-предпочитаните видове са рибка-зебра и дъгова пъстърва.

1.6.3.1. Отглеждане

За предпочитане е опитните риби да бъдат от една доставка, с еднаква големина и възраст. Те следва да се отглеждат най-малко 12 дни при следните условия:

натоварване:

подходящо за системата (рециркуляция или постоянно водопод-аване) и за видовете риба;

вода:

вж. 1.6.1.2.;

светлина:

осветление в продължение на 12 — 16 часа/дневно;

концентрация на разтворения кислород:

най-малко 80 % от стойността на въздухонаситеността на водата;

хранене:

3 пъти седмично или дневно, преустановява се 24 часа преди стартиране на теста.

1.6.3.2. Смъртност

След 48 часа от началото на периода, смъртността се отчита както следва:

— над 10 % от популацията след 7 дни:

отстранява се цялата партида;

— между 5 и 10 % от популацията:

периодът на отглеждане се продължава с още 7 дни.

Ако повече умъртвени индивиди не се намерят, партидата се одобрява (приема), в противен случай следва да бъде отстранена;

— под 5 % от популацията:

цялата партида се одобрява.

1.6.4. Адаптация

Рибите следва да бъдат поставени във вода с качеството и температурата, които ще се използват за теста, най-малко 7 дни преди да бъдат използвани.

▼B

1.6.5. Процедура на теста

Дефинитивният тест се предхожда от тест за определяне на обхвата, от който да се получи информация за диапазона на концентрациите, които ще се използват в основния експеримент.

Извършва се един контролен тест без опитното вещество и, ако е уместно, се провежда и един контролен тест със спомагателното вещество, в допълнение към опитните серии.

В зависимост от физическите и химическите свойства на опитното вещество следва да се избере подходящата за теста процедура: статичен тест, полустатичен тест или с постоянно водоподаване, за да бъдат спазени критериите за качество.

Рибите се излагат на въздействие на веществото, както е описано по-долу:

- *продължителност*: 96 часа;
- *брой на животните*: поне 7 на концентрация;
- *съдове*: с подходящ капацитет в зависимост от препоръчителното натоварване;
- *натоварване*: препоръчва се максимално натоварване от 1 g/l за статичните и полустатичните тестове, а за тези с постоянно водоподаване се допуска по-голямо натоварване;
- *опитна концентрация*: най-малко 5 концентрации, различаващи се една от друга чрез постоянен фактор, ненадвишаващ 2,2, и доколкото е възможно, разширяване на обхвата от 0 до 100 % смъртност;
- *вода*: вж. 1.6.1.2.;
- *светлина*: осветление в продължение на 12 — 16 часа/дневно;
- *температура*: подходяща за вида на рибата (допълнение 2), но с допустимото отклонение от ± 1 °C за всеки отделен тест;
- *концентрация на разтворения кислород*: не по-малко от 60 % от стойността на въздухонаситеността на водата при избраната температура;
- *хранене*: никакво.

Рибите се наблюдават след първите 2 до 4 часа и поне на интервали от 24 часа. Рибите се смятат за умрели, ако при допир на опашатите крачета няма никаква реакция и никакви признаци на дишане не са видими. Мъртвите риби се отстраняват след оглед и смъртните случаи се записват. Записват се и видимото ненормално поведение (например загуба на равновесие, промени в начина на плуване, дихателната функция, пигментацията и др.).

Ежедневно се извършват измервания на рН, разтворения кислород и температурата.

Ограничен тест

Използвайки описаните за този метод процедури, може да бъде извършен ограничен тест с натоварване 100 mg/l, за да се докаже, че LC₅₀ е по-висока от тази концентрация.

Ако естеството на веществото е такова, че концентрация от 100 mg/l в опитната вода не може да бъде постигната, следва да се извърши ограничен тест при концентрация, равна на разтворимостта на веществото (или максималната концентрация, формираща стабилна дисперсия) в използваната среда (вж. също 1.6.1.1).

▼B

Ограниченият тест следва да се извърши със 7 до 10 риби, със същия брой на контролните риби. (Според биномната теория, когато са използвани 10 риби и е регистрирана нулева смъртност, това е 99,9-процентово доказателство, че LC_{50} е по-голяма от използваната концентрация в ограничения тест. При 7, 8 или 9 риби липсата на смъртност е поне 99-процентово доказателство, че LC_{50} е по-голяма в сравнение с използваната концентрация.)

В случай на смъртност следва да се извърши пълно проучване. Ако се наблюдават почти смъртоносни въздействия, те следва да бъдат отбелязани.

2. ДАННИ И ОЦЕНКА

За всеки отчетен интервал (24, 48, 72 и 96 часа) се построява зависимост на процентната смъртност за всеки препоръчителен период на излагане спрямо стойностите на концентрация върху логаритмична хартия.

При възможност за всеки отчетен интервал LC_{50} и границите на точност ($p = 0,05$) следва да бъдат отчетени при използване на стандартните процедури; тези стойности следва да се закръгляват до един или най-много два знака (ето примери за закръгляване: 173,5 на 170; 0,127 на 0,13; 1,21 на 1,2).

В случаи, когато наклонът на кривата от съотношението концентрация/процентна смъртност е прекалено стръмен и изчисляването на LC_{50} е затруднено, достатъчна е само оценката на стойността по графиката.

Когато две концентрации при съотношение 2,2 дават показания за смъртност само 0 и 100 %, тези две стойности са достатъчни за отчитане на обхвата, в който попада LC_{50} .

Ако е забелязано, че стабилността или хомогенността на опитното вещество не може да се поддържа, това следва да бъде записано в доклада и да се внимава при интерпретацията на резултатите.

3. ДОКЛАДВАНЕ

Протоколът от изпитването следва, при възможност, да включва следната информация:

- данни за опитната риба (научно наименование, вид (род), доставчик, някакво предварително третиране, размери и брой на използваните индивиди за всяка опитна концентрация);
- източник на водата за разреждане и нейните основни химически характеристики (рН, твърдост, температура);
- в случаи, когато веществото е с ниска разтворимост във вода, да се посочват методите за приготвяне на стандартните и тестовите разтвори;
- концентрация на използваните спомагателни съединения;
- списък на използваните концентрации и всяка налична информация за стабилността в концентрациите на опитния химикал и тестовия разтвор;
- ако са извършени химически анализи, да се посочат използваните методи и получените резултати;
- резултати от ограничения тест, ако е извършен;
- обосновка за избора и подробности за използваната опитна процедура (например статичен или полустатичен метод, норма на дозите, скорост на водоподаване и аериране на водата, ако е приложено такова, натоварване на рибата и др.);

▼B

- описание на опитната апаратура;
- режим на осветление;
- концентрации на разтворения кислород, стойности на рН и температурите на тестовите разтвори на всеки 24 часа;
- доказателства, че критериите за качество са спазени;
- таблица, показваща натрупаната смъртност при всяка концентрация и контролните риби (и контролни риби със спомагателни вещества, ако се налага) на всеки от препоръчителните интервали за наблюдение;
- графика на съотношението концентрация/процентна смъртност в края на теста;
- при възможност, стойностите на LC₅₀ на всеки от препоръчителните интервали за наблюдение (при 95 % допустима точност);
- използвани статистически процедури при определяне стойностите на LC₅₀;
- ако е използвано референтно вещество, посочват се получените резултати;
- най-високата опитна концентрация, при която не е настъпила смъртност през периода на теста;
- най-ниската опитна концентрация, при която е отчетена 100-процентова смъртност по време на теста.

4. **ПРЕПРАТКИ**

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.
- (2) AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* - Static and Flow Through methods -NFT 90-303 June 1985.
- (3) AFNOR- Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* - Static and Flow – Through methods -NFT 90-305 June 1985.
- (4) ISO 7346/1,2 and/3 – Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan – Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.
- (5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.
- (6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (11) und 1 (15).
- (7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.
- (8) NEN 6506 – Water – Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.
- (9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.
- (10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4 -78-012, January 1978.

▼B

- (11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.
- (12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.
- (13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.
- (14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R., Ökotoxikologie, Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
- (15) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, *J. Pharm. tExp. Therap.*, 1949, vol. 96, 99.
- (16) Finney, D. J. *Statistical Methods in Biological Assay*. Griffin, Weycombe, U. K., 1978.
- (17) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. *Water Res.*, 1969, vol. 3, 793-821.
- (18) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. *Water Res.* 1970, vol. 4, 3-32.
- (19) Stephan, C. E. Methods for calculating an LC_{50} . In *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.
- (20) Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC_{50} . US EPA.

▼B*Допълнение 1***Пречистена вода***Пример за подходяща вода за разреждане*

Всички химикали следва да са с качество „чист за анализ“.

Използва се дестилирана вода с добро качество или дейонизирана вода с проводимост под $5 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Апаратурата за дестилиране на вода не следва да съдържа части, изработени от мед.

Стандартни разтвори

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (калциев хлорид дихидрат) 11,76 g

Разтваря се във вода и се долива до 1 литър.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (магнезиев сулфат хептахидрат) 4,93 g

Разтваря се във вода и се долива до 1 литър.

NaHCO_3 (натриев бикарбонат) 2,59 g

Разтваря се във вода и се долива до 1 литър.

KCl (калиев хлорид) 0,23 g

Разтваря се във вода и се долива до 1 литър.

Пречистена вода за разреждане

Смесват се по 25 ml от всеки от 4-те стандартни разтвора и се долива до 1 литър.

Аерира се, докато концентрацията на разтворения кислород се изравни със стойността на въздухонаситеността на водата.

pH следва да бъде $7,8 \pm 0,2$.

При необходимост pH се нагласява към това на NaOH (натриев хидроксид) или на HCl (солна киселина).

Така приготвената вода за разреждане се оставя да престои 12 часа и не следва повече да се аерира.

Сумата от калциевите и магнезиевите йони в този разтвор е 2,5 mmol/l. Съотношението на Ca:Mg йони е 4:1, а на Na:K йони — 10:1. Общата алкалност на разтвора е 0,8 mmol/l.

Евентуалните отклонения при приготвяне на водата за разреждане не следва да водят до промени в състава или свойствата на водата.



Допълнение 2

Препоръчителни видове риба за провеждане на изпитванията

Препоръчани видове	Препоръчан обхват на температурата за изпитване (°C)	Препоръчана обща дължина на експерименталното животно (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Hamilton-Buchanan) Рибка-зебра	От 20 до 24	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Rafinesque) Бодливка	От 20 до 24	5,0 ± 2,5
<i>Cyprinus carpio</i> (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Linnaeus 1758) Обикновен шаран	От 20 до 24	6,0 ± 2,0
<i>Oryzias latipes</i> (<i>Teleostei, Poeciliidae</i>) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850) Оризия	От 20 до 24	3,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (<i>Teleostei, Poeciliidae</i>) (Peters 1859) Гупи	От 20 до 24	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (<i>Teleostei, Centrarchidae</i>) (Rafinesque Linnaeus 1758) Дребна сладководна риба	От 20 до 24	5,0 ± 2,0
<i>Onchorhynchus mykiss</i> (<i>Teleostei, Salmonidae</i>) (Walbaum 1988) Дъгова пъстърва	От 12 до 17	6,0 ± 2,0
<i>Leuciscus idus</i> (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Linnaeus 1758) Златна рибка	От 20 до 24	6,0 ± 2,0

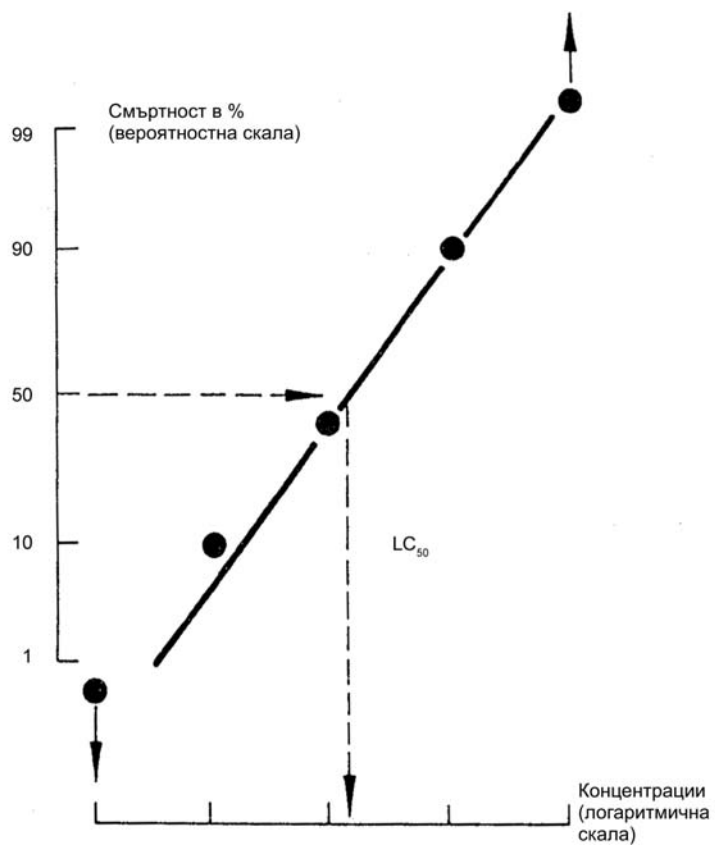
Събиране

Изброените по-горе риби са лесни за отглеждане и/или лесни за намиране през цялата година. Те могат да се развъждат и култивират в рибни ферми или в лаборатория, при условия на контрол за болести и паразити, така че експерименталните животни да бъдат здрави и с известен произход. Тези риби се намират в много части на света.

▼B

Допълнение 3

Пример за зависимостта концентрация: процент смъртност

Пример за определяне на LC_{50} , използвайки логаритмични координати.

▼B**В.2. DAPHNIA SP. ИЗПИТВАНЕ ЗА ОСТРА ИМОБИЛИЗАЦИЯ****1. МЕТОД**

Този метод за остра имобилизация е еквивалентен на OECD TG 202 (2004).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Този метод описва изпитване за остра токсичност за оценка на въздействието на химични вещества върху дафнии. Използвани са, доколкото е възможно, съществуващи методи на изпитване (1)(2)(3).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В контекста на този метод са използвани следните определения:

EC₅₀: е концентрацията, която имобилизира 50 % от дафниите в рамките на определен период на излагане. Ако се използва друго определение, то следва да е цитирано заедно с препратка.

Имобилизация: Животните, които не са в състояние да плуват до 15 секунди след лекото разклащане на съда на изпитване, се смятат за имобилизирани (дори ако все още да могат да движат антените си).

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

Млади дафнии, на възраст по-малка от 24 часа в началото на изпитването, се излагат на изпитваното вещество при редица концентрации за период от 48 часа. Имобилизацията се записва на 24-ия и 48-ия час и се сравнява с контролните стойности. Резултатите се анализират, за да се изчисли EC₅₀ на 48-ия час (вж. точка 1.2 за определенията). Определянето на EC₅₀ на 24-ия час е по избор.

1.4. ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

Разтворимостта във вода и налягането на парите на изпитваното вещество следва да са известни и следва да има надежден аналитичен метод за количествено определяне на веществото в разтворите на изпитване, като ефикасността на събиране е известна, както и границата на определяне. Ползена е информацията за структурната формула, чистотата на веществото, стабилността му във вода или на светлина, P_{ow} и резултатите от изпитването за лесна биоразградимост (вж. метод В.4).

Забележка: Насоки за изпитване на вещества с физикохимични свойства, които ги правят трудни за изпитване, са дадени в (4).

1.5. РЕФЕРЕНТНИ ВЕЩЕСТВА

Референтно вещество може да се изпита за EC₅₀ като средство за потвърждение, че условията на изпитване са надеждни. Токсикантите, които са използвани в международен ринг-тест (1)(5), са препоръчителни за тази цел (1). Препоръчва се изпитването или изпитванията с референтни вещества да се правят всеки месец или поне два пъти в годината.

(1) Резултатите от тези междулабораторни изпитвания и техническата поправка към ISO 6341 определят EC₅₀ — 24 h на калиев дихромат (K₂Cr₂O₇) в границите от 0,6 mg/l до 1,7 mg/l.

▼B

1.6. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

За да бъде едно изпитване валидно, показателите му следва да отговарят на следните критерии:

- при контролите, включително контролите, съдържащи разтварящия агент, не бива да се имобилизират повече от 10 % от дафниите;
- концентрацията на разтворения кислород в края на изпитването следва да бъде ≥ 3 mg/l в контролите съдове и съдовете за провеждане на изпитването.

Забележка: За първия критерий не повече от 10 % от контролните дафнии следва да показват имобилизация или други признаци на заболяване или стрес, например: обезцветяване, необичайно поведение, примерно невъзможност да се откъсне от водна повърхност.

1.7. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

1.7.1. Оборудване

Съдовете за изпитване и другото оборудване, което ще влезе в контакт с изпитваните разтвори, следва да бъдат изцяло стъклени или от друг химически инертен материал. Съдовете за изпитване обикновено са стъклени епруветки или колби; те следва да бъдат почистени преди всяка употреба по стандартни лабораторни процедури. Съдовете за изпитване следва да бъдат свободно покрити, за да се намали загубата на вода поради изпаряване и за да се избегне попадането на прах в разтворите. Летливите вещества следва да се изпитват при изцяло пълни затворени съдове, които да са достатъчно големи, за да може да се попречи на кислорода да стане лимитиращ фактор или съдържанието му да стане твърде ниско (вж. точка 1.6 и първи параграф от точка 1.8.3).

Освен това се използва напълно или отчасти следното оборудване: кислородометър (с микроелектрод или друго подходящо оборудване за измерване на разтворения кислород в проби с малък обем); рН-метър; подходящ прибор за контрол на температурата; оборудване за определяне на общата концентрация на органичен въглерод (TOC); оборудване за определяне на химично потребния кислород (COD); апарат за определяне на твърдостта на вода и т.н.

1.7.2. Организъм на изпитване

Daphnia magna Straus е предпочитаният вид, макар че други видове *Daphnia* също могат да бъдат използвани за това изпитване (например *Daphnia pulex*). В началото на изпитването животните следва да бъдат на възраст не по-голяма от 24 часа и за да се намали вариабилността, силно се препоръчва те да не са от едно и също първо потомство. Те следва да са от една здрава популация (т.е. такава, която не проявява признаци на стрес, като висока смъртност, наличие на мъжки и ефипии, забавяне в създаването на първото поколение, обезцветени животни и т.н.). Всички организми, които се използват за дадено изпитване, следва да са произлезли от култури, създадени от дафнии от една и съща популация. Популацията животни следва да се държи в култура с условия (светлина, температура, среда), сходни с тези, които ще се използват по време на изпитването. Ако средата на културата дафнии, която ще се използва по време на изпитването, се различава от средата, която се използва при рутинни култури дафнии, добра практика е да се предвиди предварителен период за аклиматизация преди изпитването. Затова младите дафнии следва да се държат във вода за разреждане при температурата на изпитване поне 48 часа преди началото на изпитването.

▼B**1.7.3. Вода за аклиматизиране и вода за разреждане**

Природни води (повърхностни или подпочвени), реконституирана вода или дехлорирана чешмяна вода могат да се използват за аклиматизиране и за разреждане, ако дафниите оцеляват в нея за времето на отглеждане на културата, аклиматизацията и изпитването, без да показват признаци на стрес. Всяка вода, която отговаря на химичните характеристики на вода, приемлива за разреждане, както са изброени в приложение 1, е подходяща да се използва като вода за изпитването. Тя следва да е с постоянно качество през цялото време на изпитването. Реконституирана вода може да се получи, като се добавят специфични количества реагенти от категория, призната за провеждане на опити, към дейонизирана или дестилирана вода. Примери за реконституирана вода са дадени в (1), (6) и в приложение 2. Забележете, че средите, съдържащи познати агенти, образуващи челати, като средите M4 и M7 в приложение 2, следва да се избягват при вещества на изпитване, съдържащи метал. рН следва да бъде в границите от 6 до 9. Твърдост между 40 и 250 mg/l (изразена като CaCO₃) е препоръчителна за *Daphnia Magna*, докато по-ниска твърдост може също да бъде подходяща за други видове *Daphnia*. Водата за разреждане може да се аерира преди употреба за изпитването, така че концентрацията на разтворения кислород да достигне насищане.

Ако се използва природна вода, качествените ѝ параметри следва да се измерват поне два пъти годишно или всеки път когато има подозрение, че тези характеристики може да са се променили значително (вж. предишната точка и приложение 1). Следва да се измери и съдържанието на тежките метали (например Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Ако се използва дехлорирана чешмяна вода, желателно е ежедневно да се прави хлорен анализ. Ако водата за разреждане е от повърхностен или подпочвен водоизточник, следва да се измерят проводимостта и общият органичен въглерод (TOC) или химично потребният кислород (COD).

1.7.4. Разтвори на изпитване

Разтворите на изпитване с избраните концентрации обикновено се приготвят чрез разреждане на изходен разтвор. За предпочитане е изходните разтвори да се приготвят, като се разтвори изпитваното вещество във водата за разреждане. Доколкото е възможно, следва да се избягва използването на разтворители, емулгатори или дисперсанти. Въпреки това, в някои случаи може да се налага използването на подобни съединения, за да се получи подходящо концентриран изходен разтвор. Насоки за подходящи разтворители, емулгатори и дисперсанти са дадени в (4). Във всички случаи обаче изпитваните вещества в разтворите на изпитване не следва да превишават границата на разтворимост във водата за разреждане.

Изпитването следва да се проведе без коригиране на рН. Ако рН не остане в границите 6—9, може да се наложи провеждането на второ изпитване, при което рН на изходния разтвор се коригира, за да стане еднакъв с този на водата за разреждане преди добавянето на изпитваното вещество. Корекцията на рН следва да се направи по такъв начин, че концентрацията на изходния разтвор да не се промени в значителна степен и да не се предизвика никаква химична реакция или утаяване на изпитваното вещество. За предпочитане са HCl и NaOH.

▼B

1.8. ПРОЦЕДУРА

1.8.1. Условия на излагане

1.8.1.1. *Групи на изпитване и контроли*

Съдовете за изпитването се пълнят с подходящи обеми вода за разреждане и разтвори на изпитваното вещество. Съотношението въздух/вода в съда следва да бъде еднакво за изпитваната и контролната група. Тогава в съдовете за изпитване се поставят дафниите. Поне 20 животни, за предпочитане разделени на четири групи по пет животни всяка, следва да се използват за всяка изпитвана концентрация и за контролите. Поне 2 ml от разтвора на изпитване следва да се осигури за всяко животно (т.е. обем от 10 ml за пет дафнии на съд за изпитване). Изпитването може да се осъществи, като се прави полустатично обновяване или се използва проточна система, когато концентрацията на изпитваното вещество не е стабилна.

Една контролна серия с вода за разреждане и също, ако е необходимо, една контролна серия, съдържаща разтварящ агент, следва да се изпитат в допълнение към обработените серии.

1.8.1.2. *Концентрации на изпитване*

Може да се направи изпитване за определяне на обхвата, за да се определят концентрациите за същинските изпитвания, освен ако няма налична информация за токсичността на изпитваното вещество. За тази цел дафниите се излагат на серия от много раздалечени концентрации на изпитваното вещество. Пет дафнии следва да се изложат на всяка една концентрация на изпитване за период от 48 часа или по-малко, като не са необходими репликати. Периодът на излагане може да бъде скъсен (например 24 часа и по-малко), ако данните, подходящи за целта на изпитването за определяне на обхвата, могат да се получат за по-кратко време.

Необходимо е да се използват поне пет концентрации на изпитване. Те следва да образуват геометрична прогресия с частно, за предпочитане не превишаващо 2,2. Следва да се направи обосновка, ако се използват по-малко от пет концентрации. Най-високата изпитана концентрация е добре да води до 100-процентна имобилизация, а най-ниската изпитана концентрация да не предизвиква никакъв видим ефект.

1.8.1.3. *Инкубационни условия*

Температурата следва да бъде в обхвата от 18 до 22 °C, а за всяко единично изпитване тя следва да бъде постоянна в границите ± 1 °C. Препоръчва се цикъл от 16 часа на светло и 8 часа на тъмно. Приема се също и пълна тъмнина, особено за изпитвани вещества, които са нестабилни на светлина.

Съдовете за изпитванията не следва да се аерират по време на изпитването. Изпитването следва да се проведе без коригиране на рН. Дафниите не бива да се хранят по време на изпитването.

1.8.1.4. *Продължителност*

Изпитването продължава 48 часа.

1.8.2. **Наблюдения**

Всеки съд за изпитване следва да бъде проверяван за имобилизирани дафнии на 24-ия и 48-ия час след началото на изпитването (вж. точка 1.2 за дефинициите). Освен неподвижността следва да се докладва всяко аномално поведение или такъв външен вид.

▼B**1.8.3. Аналитични измервания**

Разтвореният кислород и рН се измерват в началото и в края на изпитването в контролата/контролите и при най-високата концентрация на изпитваното вещество. Концентрацията на разтворения кислород при контролите следва да съответства на критериите за валидност (вж. точка 1.6). рН нормално не следва да варира с повече от 1,5 единици за което и да е изпитване. Температурата обикновено се измерва в контролните съдове или в околния въздух и следва да се регистрира, препоръчително е непрекъснато, през цялото време на изпитването или като минимум — в началото и в края на изпитването.

Концентрацията на изпитваното вещество следва да се измерва като минимум в най-високата и най-ниската концентрация на изпитване, в началото и в края на изпитването (4). Препоръчително е резултатите да се основават върху измерените концентрации. Въпреки това, ако има данни, които показват, че концентрацията на изпитваното вещество се поддържа достатъчно добре в рамките на $\pm 20\%$ от номиналната или първоначалната измерена концентрация през цялата продължителност на изпитването, то резултатите могат да се основат на номиналната или измерената първоначална стойност.

1.9. ИЗПИТВАНЕ ЗА ГРАНИЦИТЕ

Използвайки процедурата, описана в този метод, може да се направи гранично изпитване при 100 mg/l от изпитваното вещество или при неговата граница на разтворимост в средата за изпитване (тази която е по-ниска), за да се покаже, че EC_{50} е по-голяма от тази концентрация. Изпитването за границите следва да се проведе с 20 дафнии (за предпочитане е в четири групи по пет), със същия брой в контролата/контролите. Ако настъпи някаква имобилизация, следва да се направи цялостно изследване. Всякакво аномално поведение следва да бъде отбелязано.

2. ДАННИ

Данните следва да бъдат обобщени в таблична форма, като показват за всяка третирана група и контролите, броя на използваните дафнии и регистрираната имобилизация при всяко наблюдение. Процентът на имобилизираните на 24-ия и 48-ия час се представя графично срещу концентрациите на изпитване. Данните се анализират с помощта на подходящи статистически методи (например пробит-анализ и др.), за да се изчислят наклоните на кривите и EC_{50} с 95 % граница на вероятност ($p = 0,05$) (7) (8).

Когато стандартните методи за изчисляване на EC_{50} не са приложими за получените данни, следва да се използват най-високата концентрация, непричиняваща имобилизация, и най-ниската концентрация, предизвикваща 100 % имобилизация, като приближения на EC_{50} (това се смята за средно геометрично на тези две концентрации).

3. ДОКЛАДВАНЕ**3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Протоколът от изпитването следва да съдържа следното:

Изпитвано вещество:

— физична природа и имащи отношение физикохимични свойства;

▼B

— химични идентификационни данни, включително чистота.

Животински вид за изпитването:

— източник и вид *Daphnia*, доставчик на източника (ако е известен), и използвани условия за културата (включително източник, вид и количество храна, честота на хранене).

Условия на изпитване:

— описание на съдовете за изпитване: тип съдове, обем на разтвора, брой дафнии на съд за изпитване, брой на съдовете за изпитване (репликати) на концентрация;

— методи на подготовка на изходните разтвори и на изпитване, включително използването на каквито и да било разтворители или дисперсанти, използвани концентрации;

— подробности за водата за разреждане: източник и качествени характеристики на водата (рН, твърдост, съотношение Са/Мg, съотношение Na/К, алкалност, проводимост и др.); състав на реконституираната вода, ако е използвана такава;

— инкубационни условия: температура, светлинен интензитет и периодичност, разтворен кислород, рН и др.

Резултати:

— броят и процентът на дафниите, които са имобилизирани или проявяват някакви неблагоприятни ефекти (включително аномално поведение) в контролите и във всяка третирана група, при всяко наблюдение, описание на природата на наблюдаваните ефекти;

— резултати и дата на извършеното изпитване с референтно вещество, ако има такива;

— следва да бъдат докладвани също и номиналните концентрации на изпитване, и резултатът от всички анализи за определяне на концентрацията на изпитваното вещество в съдовете за изпитване; ефикасността на събиране на метода и границите на определяне;

— всички физикохимични измервания на температура, рН и разтворен кислород, направени по време на изпитването;

— ЕС₅₀ на 48-ия час за имобилизация с интервалите на надеждност и графики от модела, използван за тяхното изчисляване, наклона на кривите на реакция на дозата и тяхната стандартна грешка; статистически процедури, използвани при определяне на ЕС₅₀ (тези данни за имобилизация на 24-ия час също следва да се докладват, когато са измерени);

— обяснение на всякакви отклонения от метода на изпитване и дали тези отклонения влияят върху резултатите от изпитването.

4. ПРЕПРАТКИ

- (1) ISO 6341. (1996). Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test. Third edition, 1996.
- (2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

- (3) Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
- (4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.
- (5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia*.
- (6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.
- (7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F. I. Mayer and J. L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials. Pp 65—84
- (8) Finney D. J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B*Приложение 1***НЯКОИ ХИМИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПРИЕМЛИВАТА ВОДА
ЗА РАЗРЕЖДАНЕ**

Вещество	Концентрация
Суспендирани вещества	< 20 mg/l
Общ органичен въглерод	< 2mg/l
Свързани амониеви йони	< 1 µg/l
Остатъчен хлор	< 10 µg/l
Общи органофосфорни пестициди	< 50 ng/l
Общи органохлорни пестициди плюс полихлорирани бифенили	< 50 ng/l
Общ органичен хлор	< 25 ng/l



Приложение 2

ПРИМЕРИ ЗА ПОДХОДЯЩА РЕКОНСТИТУИРАНА ВОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

ISO Вода за изпитване (1)

Изходни разтвори (едно вещество)		За приготвянето на реконституирана вода се добавят следните обеми от изходните разтвори към 1 литър вода (*)
вещество	количество, добавено към 1 литър вода (*)	
Калциев хлорид CaCl ₂ , 2H ₂ O	11,76 g	25 ml
Магнезиев сулфат MgSO ₄ , 7H ₂ O	4,93 g	25 ml
Натриев бикарбонат NaHCO ₃	2,59 g	25 ml
Калиев хлорид KCl	0,23 g	25 ml

(*) Вода с подходяща чистота, например дейонизирана, дестилирана или преминала обратна осмоза, като проводимостта ѝ за предпочитане не превишава 10 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Среди Elendt M7 и M4

Аклиматизация към среди Elendt M4 и M7

Някои лаборатории са изпитали затруднения при прекия пренос на *Daphnia* в среди M4 и M7. Въпреки това е постигнат известен успех при постепенната аклиматизация, т.е. преместването от собствената среда в 30 % Elendt, после в 60 % Elendt и след това в 100 % Elendt. Периодите на аклиматизация могат да продължат до месец.

Подготовка

Остатъчен елемент

Отделните изходни разтвори (I) на индивидуални остатъчни елементи първо се подготвят във вода с подходяща чистота, напр. дейонизирана, дестилирана или чрез обратна осмоза. От тези различни изходни разтвори (I) се подготвя (II) втори еднократен изходен разтвор, който съдържа всичките остатъчни елементи (комбиниран разтвор), т.е.:

Изходен(и) разтвор(и) I (едно вещество)	Количество, добавено към вода (mg/l)	Концентрация (по отношение на средата M4)	За подготовката на комбинирания изходен разтвор II се добавя следното количество от изходен разтвор I към водата (ml/l)	
			M4	M7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000 пъти	1,0	0,25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	7 210	20 000 пъти	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 пъти	1,0	0,25

▼B

Изходен(и) разтвор(и) I (едно вещество)	Количество, добавено към вода (mg/l)	Концентрация (по отношение на средата M4)	За подготовката на комбинирания изходен разтвор II се добавя следното количество от изходен разтвор I към водата (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000 пъти	1,0	0,25
SrCl ₂ .6H ₂ O	3 040	20 000 пъти	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 пъти	1,0	0,25
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1 230	20 000 пъти	1,0	0,25
CuCl ₂ .2H ₂ O	335	20 000 пъти	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000 пъти	1,0	1,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	200	20 000 пъти	1,0	1,0
KI	65	20 000 пъти	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000 пъти	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000 пъти	1,0	1,0
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	5 000	2 000 пъти	—	—
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 991	2 000 пъти	—	—

Както Na₂ EDTA, така и FeSO₄ разтворите се приготвят поединично, събират се аедно и веднага се поставят в автоклав.

Това дава:

2 l Fe-EDTA разтвор		1 000 пъти	20,0	5,0
---------------------	--	------------	------	-----

M4 и M7 среда

M4 и M7 среда се приготвят, като се използва изходен разтвор II, макронутриенти и витамини, както следва:

	Количество, добавено към водата (mg/l)	Концентрация (по отношение на средата M4)	Количество от изходния разтвор II, добавено, за да се приготви средата (ml/l)	
			M4	M7
Изходен разтвор II (комбинирани остатъчни елементи)		20 пъти	50	511
Макронутриентни изходни разтвори (едно вещество)				
CaCl ₂ .2H ₂ O	293 800	1 000 пъти	1,0	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	246 600	2 000 пъти	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 пъти	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000 пъти	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	50 000	5 000 пъти	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000 пъти	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000 пъти	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 840	10 000 пъти	0,1	0,1

▼B

	Количество, добавено към водата (mg/l)	Концентрация (по отношение на средата M4)	Количество от изходния разтвор II, добавено, за да се приготви средата (ml/l)	
			M4	M7
Изходни комбинирани витамини	—	10 000 пъти	0,1	0,1

Изходният разтвор комбинирани витамини е изготвен чрез добавяне на 3 витамина към 1 литър вода, както е показано по-долу:

Тиамин хидрохлорид	750	10 000 пъти		
Цианокобаламин (B ₁₂)	10	10 000 пъти		
Биотин	7,5	10 000 пъти		

Изходните комбинирани витамини се съхраняват замразени на малки равни части. Витамините се добавят към средата малко преди употреба.

Забележка: За да се избегне утаяването на солите, когато се приготвя пълната среда, добавете съхранените малки количества на изходните разтвори към около 500—800 ml дейонизирана вода и после допълнете до 1 литър.

Забележка: Първата публикация за M4 средата е на Elendt, В. Р. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25—33.

▼ M6**В.3. СЛАДКОВОДНИ ВОДОРАСЛИ И ЦИАНОБАКТЕРИИ,
ИЗПИТВАНЕ ЗА ПОТИСКАНЕ НА РАСТЕЖА**

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 201 (2006, приложение, коригирано през 2011 г.). Установена е необходимост от разширяване на обхвата на метода на изпитване, за да се включат допълнителни видове, и от актуализиране, с оглед съответствие с изискванията за оценяване на риска и класифициране на химикали. Това преразглеждане беше извършено въз основа на обширен практически опит, на научния напредък в сферата на изследванията за токсичност при водораслите и широкообхватна регулаторна употреба, която е налице след първоначалното приемане.
2. Определенията, които са използвани, са дадени в допълнение 1.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

3. Целта на настоящото изпитване е да се определят въздействията на даден химикал върху растежа на сладководните микроводорасли и/или цианобактерии. Експоненциално растящите изпитвани организми са изложени на действието на изпитвания химикал в периодични култури, обикновено за период от 72 часа. Въпреки относително кратката продължителност на изпитването могат да бъдат оценени въздействията върху няколко поколения.
4. Откликът на системата е намаляване на растежа в серии култури от водорасли (изпитвани единици), изложени на действието на различни концентрации на изпитвания химикал. Откликът се оценява като функция на концентрацията на експозиция в сравнение със средния растеж на повторни, неизложени на въздействие контролни култури. За пълното представяне на отклика на системата на токсични въздействия (оптимална чувствителност) на културите се дава възможност за неограничен експоненциален растеж в условия на достатъчно хранителни вещества и непрекъсната светлина в течение на достатъчен период от време, за да се измери намаляването на специфичната скорост на растеж.
5. Растежът и потискането на растежа се определят количествено чрез измервания на биомасата от водорасли като функция на времето. Биомасата на водорасли се определя като сухо вещество за единица обем, например mg водорасли на литър изпитван разтвор. Въпреки това сухото вещество се измерва трудно и следователно се използват сурогатни параметри. От тези сурогати най-често се използва броят клетки. Други сурогатни параметри включват обем на клетката, флуоресценция, оптична плътност и т.н. Трябва да е известен факторът на преобразуване между измервания сурогатен параметър и биомасата.
6. Крайната точка на изпитването е потискането на растежа, изразено като логаритмично нарастване в биомасата (средната специфична скорост на растеж) по време на периода на експозиция. От средните специфични скорости на растеж, регистрирани в серия от изпитвани разтвори, се определя концентрацията, при която се осъществява потискане на скоростта на растежа до определените x % (например 50 %) и се изразява като E_rC_x (напр. E_rC_{50}).
7. Допълнителна зависима променлива, използвана в настоящия метод на изпитване, е добивът, който може да е необходим, за да бъдат изпълнени специфични регулаторни изисквания в някои държави. Той се определя като биомасата в края на периода на експозиция минус биомасата в началото на периода на експозиция. От добива, регистриран в серия от разтвори на изпитване, се изчислява концентрацията, при която се осъществява потискане на добива до определените x % (например 50 %) и се изразява като E_yC_x (напр. E_yC_{50}).
8. В допълнение най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект (ЛОЕС) и концентрацията без наблюдавано въздействие (НОЕС) могат да бъдат определени статистически.

▼ **M6****ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНИЯ ХИМИКАЛ**

9. Информацията за изпитвания химикал, която може да се използва при установяването на условията за изпитване, включва структурната формула, чистотата, устойчивостта на светлина, устойчивостта при условията на изпитването, свойствата на поглъщане на светлината, рКа и резултатите от изследванията на трансформацията, включително биоразградимостта във вода.
10. Разтворимостта във вода, коефициентът на разпределение октанол/вода (P_{ow}) и парното налягане на изпитвания химикал трябва да са известни и да е на разположение валидиран метод за количествено определяне на химикала в изпитваните разтвори с отчетени коефициент на аналитичния добив и граница на откриването.

ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

11. За да е валидно изпитването, трябва да бъдат изпълнени следните критерии за резултати:
 - Биомасата в контролните култури би трябвало да се е увеличила експоненциално с кратност най-малко 16 в рамките на 72-часовия период на изпитване. Това съответства на специфична скорост на растеж от $0,92 \text{ ден}^{-1}$. За най-често използваните видове скоростта на растеж обикновено е съществено по-висока (вижте допълнение 2). Този критерий може да не бъде изпълнен, когато се използват видове, които растат по-бавно от изброените в допълнение 2. В този случай периодът на изпитване се удължава, за да се получи поне 16-кратен растеж на контролните култури, като същевременно растежът трябва да бъде експоненциален през целия период на изпитване. Периодът на изпитване може да бъде намален на поне 48 часа, за да се поддържа неограничен експоненциален растеж по време на изпитването, при условие че се постига минимална кратност от 16.
 - Средният коефициент на вариация за специфични скорости на растеж по сектори (дни 0 — 1, 1 — 2 и 2 — 3, за 72-часови изпитвания) в контролните култури (вж. допълнение 1, „коефициент на вариация“) не трябва да превишава 35 %. Да се направи справка с точка 49 за изчисляване на специфичната скорост на растеж по сектори. Този критерий се прилага за средната стойност на коефициентите на вариация, изчислени за повторните контролни култури.
 - Коефициентът на вариация на средните специфични скорости на растеж по време на целия период на изпитване в повторни контролни култури не трябва да превишава 7 % в изпитванията с *Pseudokirchneriella subcapitata* и *Desmodesmus subspicatus*. За други, по-рядко изпитвани видове, стойността не следва да превишава 10 %.

РЕФЕРЕНТНИ ХИМИКАЛИ

12. Референтният химикал (референтните химикали), като например 3,5-дихлорофенол, използван в международното кръгово изпитване (1), може да бъде изпитван като средство за проверка на процедурата за изпитване. Калиевият дихромат също може да бъде използван като референтен химикал за зелените водорасли. Желателно е референтният химикал да се изпитва най-малко два пъти годишно.

ПРИЛОЖИМОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

13. Настоящият метод за изпитване е най-лесно приложим към водоразтворими химикали, за които е вероятно при условията на изпитването да останат във водата. За изпитването на химикали, които са летливи, силно адсорбиращи, оцветени, със слаба водоразтворимост или химикали, които могат да повлияят на наличността на хранителни

▼ M6

вещества или минерали в средата на изпитване, може да са нужни определени изменения на описаната процедура (например затворена система, кондициониране на съдовете за изпитване). Указания за някои подходящи изменения са дадени в (2)(3) и (4).

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ**Апаратура**

14. Съдовете за изпитване и другите апарати, които ще бъдат в контакт с изпитваните разтвори, трябва да бъдат направени изцяло от стъкло или друг химически инертен материал. Елементите трябва да бъдат добре почистени, за да се гарантира, че няма органични или неорганични замърсители, които да повлияят на растежа на водораслите или върху състава на изпитваните разтвори.
15. Съдовете за изпитване обикновено са стъклени колби с размери, които позволяват обем на културата, достатъчен за измервания по време на изпитването, и достатъчно масопренасяне на CO₂ от атмосферата (вижте параграф 30). Да се има предвид, че обемът на течността трябва да бъде достатъчен за аналитично определяне (вж. точка 37).
16. В допълнение могат да се изискват някои или всички от следните уреди:
 - Апаратура за култивиране: препоръчва се шкаф или камера, в който избраната инкубационна температура да може да бъде поддържана с ± 2 °C.
 - Уреди за измерване на светлината: важно е да се отбележи, че методът на измерване на интензитета на светлината, и по-специално видът на рецептора (колектора), може да окаже въздействие върху измерената стойност. Препоръчително е измерванията да бъдат направени с използването на сферичен (4 π) рецептор (който реагира на пряка и отразена светлина от всички ъгли над и под равнината на измерване), или 2 π рецептор (който реагира на светлината от всички ъгли над равнината на измерване).
 - Апарат за определяне на биомасата от водорасли. Преброяването на клетки, което е най-често използваният сурогатен параметър за биомаса от водорасли, може да бъде направено с използването на електронен брояч на частици, микроскоп с броячна камера или поточен цитометър. Другите заместители на биомасата могат да бъдат измерени с използването на поточен цитометър, флуориметър, спектрофотометър или колориметър. Полезно е да се изчисли коефициент на превръщане, свързващ броя на клетките със сухото тегло. За да се осигурят полезни измервания при ниски концентрации на биомаса при използването на спектрофотометър, може да е необходимо да се използват кювети с дължина на светлинния път поне 4 cm.

Изпитвани организми

17. Могат да се използват няколко вида неприкрепени микроводорасли и цианобактерии. Щамовете, изброени в допълнение 2, са демонстрирани като подходящи при използването на процедурата на изпитване, определена в настоящия метод на изпитване.
18. Ако се използват други видове, следва да се протоколира щамът и/или произходът. Трябва да бъде потвърдено, че експоненциалният растеж на избраните изпитвани водорасли може да бъде поддържан по време на периода на изпитване при преобладаващите условия.

Среда на растеж

19. Препоръчват се две алтернативни среди на растеж, средите на ОИСР и на ААР. Съставът на тези среди е показан в допълнение 3. Да се има предвид, че първоначалната стойност на рН и буферният капацитет (регулиращ увеличаването на рН) на двете среди са различни. Следователно резултатите от изпитванията могат да бъдат различни в зависимост от използваната среда, особено когато се изпитват йонизиращи химикали.

▼ M6

20. Може да е необходимо изменение на средата на растеж за определени цели, например когато се изпитват метали или хелатни агенти или за изпитване на различни стойности на рН. Използването на изменена среда трябва да бъде подробно описано и обосновано (3) (4).

Начална концентрация на биомасата

21. Началната биомаса в изпитваните култури трябва да бъде еднаква във всички изпитвани култури и достатъчно ниска, за да позволява експоненциален растеж през целия инкубационен период без риск от изчерпване на хранителните вещества. Началната биомаса не трябва да превишава 0,5 mg/l като сухо тегло. Препоръчват се следните начални концентрации на клетки:

Pseudokirchneriella subcapitata: $5 \times 10^3 - 10^4$ клетки/ml

Desmodesmus subspicatus 2-5 $\times 10^3$ клетки/ml

Navicula pelliculosa 10^4 клетки/ml

Anabaena flos-aquae 10^4 клетки/ml

Synechococcus leopoliensis $5 \times 10^4 - 10^5$ клетки/ml

Концентрации на изпитвания химикал

22. Диапазонът на концентрациите, в който е възможно да настъпят въздействия, може да бъде определен на базата на резултати от изпитвания за определяне на обхвата. За крайното определящо изпитване трябва да се изберат поне пет концентрации, подредени в геометрична прогресия с частно, което не превишава 3,2. За изпитвани химикали, показващи полегата крива концентрация-отклик, може да бъде обосновано и по-високо частно. Поредицата от концентрации трябва по възможност да обхваща диапазона, при който се постига 5—75 % потискане на скоростта на растеж на водораслите.

Повторения и контролни проби

23. Планът на изпитването следва да включва три повторения от всяка една изпитвана концентрация. Ако не се изисква определяне на NOEC, планът на изпитването може да бъде изменен, за да се увеличи броят на концентрациите и да се намали броят на повторенията за всяка концентрация. Броят на контролните повторения трябва да бъде поне три и в най-добрия случай следва да бъде два пъти повече от броя на повторенията, използвани за всяка една изпитвана концентрация.
24. Може да бъде приготвен отделен набор от изпитвани разтвори за аналитично определяне на концентрациите на изпитвания химикал (вж. точки 36 и 38).
25. Когато се използва разтворител, за да се разтвори изпитваният химикал, в плана на изпитването трябва да бъдат включени допълнителни контролни проби, съдържащи разтворителя в същата концентрация, каквато е използвана в изпитваните култури.

Подготвяне на инокулант

26. За да се адаптират изпитваните водорасли към условията за изпитване и да се гарантира, че водораслите са във фаза на експоненциален растеж, когато се използват за инокулация на изпитваните разтвори, се приготвя инокулант в изпитваната среда 2 — 4 дни преди започване на изпитването. Биомасата от водорасли следва да бъде приспособена, за да се осигури преобладаване на експоненциалния растеж в инокуланта до започване на изпитването. Инокулантът се инкубира при същите условия като изпитваните култури. Измерва се увеличаването на биомасата в инокуланта, за да се гарантира, че растежът е в

▼ **M6**

рамките на нормалния диапазон за изпитвания щам при условията за култивиране. В допълнение 4 е описан пример за процедурата на култивиране на водорасли. За да се избегне синхронното делене на клетките по време на изпитването, би могло да се наложи втори стадий в размножаването на инокуланта.

Приготвяне на изпитваните разтвори

27. Всички разтвори за изпитване трябва да съдържат еднакви концентрации на средата на растеж и начална биомаса на изпитваните водорасли. Изпитваните разтвори на избраните концентрации обикновено се приготвят чрез смесване на изходен разтвор на изпитвания химикал със средата на растеж и инокуланта. Изходните разтвори обикновено се приготвят чрез разтваряне на химикала в изпитваната среда.
28. Разтворители, като например ацетон, *трет*-бутилов алкохол и диметилформамид, могат да се използват като носители за добавяне към изпитваната среда на химикали с малка разтворимост във вода (2)(3). Концентрацията на разтворителя не трябва да превишава 100 µl/l и към всички култури (включително и контролните) в изпитваните серии следва да се добави същата концентрация на разтворителя.

Инкубация

29. Съдовете за изпитване се запущат с въздухопропускливи запушалки. Съдовете се разклащат и поставят в апаратурата за култивиране. По време на изпитването е необходимо водораслите да се държат в суспензия и да се улесни преносът на CO₂. За тази цел следва да се извършва постоянно разклащане или разбъркване. Културите трябва да се поддържат при температура от 21 до 24 °C с регулиране в границите на ± 2 °C. За видовете, различни от посочените в допълнение 2, например тропическите видове, може да са подходящи по-високи температури, при условие че могат да бъдат изпълнени критериите за валидност. Препоръчва се колбите да бъдат поставяни на случаен принцип и местата им в инкубатора да бъдат сменяни всеки ден.
30. Стойността на рН на контролната среда не трябва да се повишава с повече от 1,5 единици по време на изпитването. За метали и химикали, които частично се йонизират при стойности на рН около стойността на рН при изпитването, може да е нужно ограничаване на отклонението на рН, за да се получат възпроизводими и добре дефинирани резултати. Отклонение < 0,5 рН единици е технически осъществимо и може да бъде постигнато с осигуряване на адекватна скорост на масопрехвърляне на CO₂ от заобикалящия въздух към изпитвания разтвор, например чрез увеличаване на честотата на разклащане. Друга възможност е да се намали потребността от CO₂ чрез намаляване на първоначалната биомаса или продължителността на изпитването.
31. Повърхността, където културите се инкубират, следва да получава непрекъсната, хомогенна флуоресцентна светлина, например от вида „студена бяла светлина“ или „дневна светлина“. Щамовете от водорасли и цианобактерии се различават по отношение на изискванията си за светлина. Интензитетът на светлината следва да бъде избран така, че да подхожда на използвания изпитван организъм. За препоръчваните видове зелени водорасли интензитетът на светлината на нивото на изпитваните разтвори се избира в диапазона от 60—120 µE · m⁻² · s⁻¹, когато се измерва във фотосинтетично ефективния диапазон от дължини на вълната от 400—700 nm с използването на подходящ рецептор. Някои видове, по-специално *Anabaena flos-aquae*, растат добре при по-ниски интензитети на светлина и могат да бъдат увредени при високи интензитети. За такива видове следва да се избере среден интензитет на светлината в диапазона 40—60 µE · m⁻² · s⁻¹. (За уреди за измерване на светлината, калибрирани в lux, еквивалентният диапазон от 4 440—8 880 lux за студена бяла светлина съответства приблизително на препоръчвания интензитет на светлината от 60—120 µE · m⁻² · s⁻¹). Светлинният интензитет се поддържа в рамките на ± 15 % от средния интензитет на светлината над инкубационната площ.

▼ M6**Продължителност на изпитването**

32. Продължителността на изпитването обикновено е 72 часа. Въпреки това може да се използва по-кратка или по-дълга продължителност на изпитванията, при условие че могат да бъдат спазени всички критерии за валидност в параграф 11.

Измервания и аналитични определения

33. Биомасата от водорасли във всяка колба се определя най-малко веднъж дневно по време на изпитването. Ако измерванията се правят на малки обеми, взети от изпитвания разтвор с пипета, те не бива да се връщат обратно.
34. Измерването на биомасата се извършва чрез ръчно преброяване на клетките с микроскоп или електронен брояч на частици (чрез преброяване на клетки и/или обем на биомасата). Могат да се използват алтернативни техники, например поточна цитометрия, *in vitro* или *in vivo* хлорофилина флуоресценция (5) (6) или оптична плътност, при условие че може да бъде демонстрирана задоволителна корелация с биомасата в диапазона на биомасата, който се среща по време на изпитването.
35. Стойността на рН на разтворите се измерва в началото и в края на изпитването.
36. При условие че е налице аналитична процедура за определяне на изпитвания химикал в използвания диапазон на концентрацията, изпитваните разтвори следва да бъдат анализирани, за да се потвърдят първоначалните концентрации и поддържането на концентрациите на експозиция по време на изпитването.
37. Анализът на концентрацията на изпитвания химикал в началото и в края на изпитването при ниска и висока изпитвана концентрация, както и на концентрация около очакваната EC_{50} може да е достатъчен в случаите, при които има вероятност концентрациите на експозиция да варират с по-малко от 20 % от номиналните стойности по време на изпитването. Препоръчва се анализ на всички изпитвани концентрации в началото и в края на изпитването, ако вероятността концентрациите да останат в рамките на 80—120 % от номиналните е малка. За летливи, нестабилни или силно адсорбиращи изпитвани химикали се препоръчва допълнително вземане на проби за анализ на 24-часови интервали по време на периода на експозиция, за да се определи по-добре загубата на изпитвания химикал. За тези химикали може да са необходими допълнителни повторения. Във всички случаи е необходимо определянето на концентрациите на изпитвания химикал да бъде извършвано само в един съд с повторна проба при всяка една изпитвана концентрация (или в обединеното съдържание на съдовете от повторенията).
38. Изпитваната среда, приготвена специално за анализ на концентрации на експозиция по време на изпитването, следва да бъде третирана по същия начин както тези, използвани за изпитването, т.е., тя трябва да бъде инокулирана с водорасли и инкубирана при същите условия. Ако се изисква анализ на концентрацията на разтворения изпитван химикал, може да е нужно да се отделят водораслите от средата. За предпочитане е отделянето да се прави чрез центрофугиране при ниска сила на притегляне, достатъчна за утаяване на водораслите.
39. Ако има доказателство, че през цялото време на изпитването концентрацията на химикала, който се изпитва, е била задоволително поддържана в рамките на $\pm 20\%$ от номиналната или измерената първоначална концентрация, анализът на резултатите може да бъде базиран на номиналната или на измерената първоначална стойност. Ако отклонението от номиналната или измерената първоначална концентрация е по-голямо от $\pm 20\%$, анализът на резултатите следва да се основава на средногеометричната концентрация по време на експозиция или на модели, описващи намаляването на концентрацията на изпитвания химикал (3) (7).

▼ M6

40. Изпитването за потискане на растежа на водораслите е по-динамична система за изпитване от повечето други краткосрочни изпитвания за токсичност във водна среда. Като следствие може да е трудно да се определят действителните концентрации на експозиция, особено за адсорбиращи химикали, изпитвани при ниски концентрации. В такива случаи изчезването на изпитвания химикал от разтвора чрез адсорбция към увеличаващата се биомаса от водорасли не означава, че той е изгубен от системата за изпитване. Когато се анализира резултатът от изпитването, следва да се провери дали намаляването на концентрацията на изпитвания химикал в процеса на изпитване се придружава от намаляване в потискането на растежа. Ако това е така, може да се обмисли прилагането на подходящ модел, който описва намаляването на концентрацията на изпитвания химикал (7). В противен случай може да е подходящо анализът да се базира на резултатите от първоначалните (номинални или измерени) концентрации.

Други констатации

41. Следва да бъдат извършени наблюдения с микроскоп, за да се потвърди нормалният и здрав външен вид на инокуланта, както и да се види дали има отклоняващи се от нормата промени във външния вид на водораслите (които могат да бъдат причинени от експозицията на въздействието на изпитвания химикал) в края на изпитването.

Гранично изпитване

42. При определени условия, например когато предварителното изпитване показва, че изпитваният химикал няма токсични въздействия при концентрации до 100 mg/l или до неговата граница на разтворимост в изпитваната среда (в зависимост от това кое е по-ниско), може да бъде осъществено гранично изпитване, включващо сравнение на отклика в контролна група и в една от третираните групи (100 mg/l или концентрация, равна на границата на разтворимост). Настоятелно се препоръчва това да бъде подкрепено с анализ на концентрацията на експозиция. Всички предходно описани условия на изпитване и критерии за валидност се прилагат към граничното изпитване, с изключение на това, че броят на третираните повторения трябва да бъде най-малко шест. Зависимите променливи в контролната и третираната група могат да бъдат анализирани с използването на статистически тест за сравняване на средните стойности, например t-тест на Стюдънт. Ако дисперсиите в двете групи не са еднакви, трябва да бъде извършен t-тест, коригиран за нееднакви дисперсии.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Построяване на криви на растежа**

43. Биомасата в съдовете за изпитване може да се изрази в единици на сурогатния параметър, използван за измерване (например брой клетки, флуоресценция).
44. Представя се в табличен вид изчислената концентрация на биомасата в изпитваните култури и контролните проби заедно с концентрациите на изпитвания материал и времената на измерване, записани с разделителна способност най-малко час, за да се начертаят графики на кривите на растежа. На този първи етап може да са полезни както логаритмични, така и линейни скали, но логаритмичните скали са задължителни и в общия случай дават по-добро представяне на вариациите в модела на растежа по време на периода за изпитване. Да се има предвид, че експоненциалният растеж дава права линия, когато се начертае в логаритмична скала, и че ъгълът на наклона на линията (наклон) показва специфичната скорост на растеж.
45. Като се използват графиките, се проверява дали контролните култури растат експоненциално с очакваната скорост през цялото изпитване. Внимателно се разглеждат всички точки с данни и видят на графиките и се проверяват необработените данни и процедурите за евентуални грешки. По-специално, проверяват се точките с данни, за които изглежда, че се отклоняват поради системна грешка. Ако е очевидно, че с голяма вероятност могат да се установят и/или предположат процедурни грешки, специфичната точка с данни се маркира

▼ M6

като стойност, силно различаваща се от нормалните, и не се включва в последващия статистически анализ. (Нулева концентрация на водорасли в един от двата или трите съда с повторения може да показва, че съдът не е инокулиран правилно или не е бил почистен добре). Причините за отхвърлянето на точка с данни като стойност, силно различаваща се от нормалните, трябва да се формулират ясно в протокола от изпитването. За приемливи причини се смятат само (редки) грешки в процедурата, а не просто недостатъчно добра прецизност. Статистическите процедури за идентифициране на стойности, силно различаващи се от нормалните, имат ограничено използване за този тип проблем и не могат да заменят експертната преценка. Препоръчително е стойностите, силно различаващи се от нормалните (маркирани като такива), да се запазят между точките с данни, показани в последващите графични или таблични представяния на данни.

Зависими променливи

46. Целта на изпитването е да се определят въздействията на изпитвания химикал върху растежа на водораслите. Настоящият метод за изпитване описва две зависими променливи, тъй като различните юрисдикции имат различни предпочитания и регулаторни нужди. За да се приемат резултатите от изпитването във всички държави членки, въздействията следва да се оценяват с използването и на двете зависими променливи а) и б), описани по-долу.
- а) Средна специфична скорост на растеж: тази зависима променлива се изчислява на базата на логаритмичното нарастване на биомасата през периода на изпитването, изразено за ден
- б) Добив: тази зависима променлива представлява биомасата в края на изпитването минус началната биомаса.
47. Следва да се отбележи, че стойностите на токсичността, изчислени с помощта на тези две зависими променливи, не са сравними и тази разлика трябва да се разпознава, когато се използват резултатите от изпитването. Стойностите на EC_{50} , базирани на средната специфична скорост на растеж ($E_r C_x$), по правило ще бъдат по-високи от резултатите, базирани на добива ($E_y C_x$), ако се придържате към условията за изпитване на настоящия метод за изпитване, което се дължи на математическата основа на съответните подходи. Това не трябва да се интерпретира като разлика в чувствителността между двете зависими променливи — стойностите просто са различни от математическа гледна точка. Понятието за средна специфична скорост на растеж се основава на общия модел на експоненциален растеж на водораслите в неограничени култури, където токсичността се оценява на базата на въздействието върху скоростта на растежа, без да зависи от абсолютното ниво на специфичната скорост на растеж на контролната проба, от наклона на кривата концентрация-отклик или от продължителността на изпитването. Противоположно на това, резултатите, базирани на зависимата променливата за добива, зависят от всички тези други променливи. $E_y C_x$ зависи от специфичната скорост на растеж на вида водорасли, използвани във всяко от изпитванията, и от максималната специфична скорост на растеж, която може да варира между видовете и дори между различните щамове на водорасли. Тази зависима променлива не трябва да се използва за сравняване на чувствителността към токсични вещества между видовете водорасли или дори между различните щамове. Докато използването на средната специфична скорост на растеж за оценяване на токсичността е за предпочитане от научна гледна точка, оценките за токсичността, базирани на добива, също са включени в настоящия метод за изпитване, за да удовлетворят действащите регулаторни изисквания в някои държави.

Средна скорост на растеж

48. Средната специфична скорост на растеж за определен период се изчислява като логаритмичното нарастване на биомасата от уравнението за всеки отделен съд с контролни проби и третираны проби [1]:

▼ **M6**

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{ден}^{-1}) \quad [1],$$

където:

μ_{i-j} е средната специфичната скорост на растеж за време от i до j ;

X_i е биомасата в момента i ;

X_j е биомасата в момента j

Изчислява се средната стойност за скоростта на растеж заедно с оценки на дисперсията за всяка група третирана проби и контролна група.

49. Изчислява се средната специфична скорост на растеж в течение на целия период на изпитването (обикновено дни 0—3) с използване на номинално инокулираната биомаса като начална стойност, а не измерената начална стойност, защото по този начин обикновено се получава по-голяма прецизност. Ако оборудването, което се използва за измерване на биомасата, позволява достатъчно прецизно определяне на малката биомаса на инокулума (например поточен цитометър), тогава може да се използва измерената първоначална концентрация на биомаса. Освен това се оценява скоростта на растеж по сектори, изчислена като специфичните скорости на растеж за всеки ден по време на изпитването (дни 0 — 1, 1 — 2 и 2 — 3), и се проверява дали скоростта на растеж на контролната проба остава постоянна (вж. критериите за валидност, точка 11). Значително по-ниската специфична скорост на растеж в първия ден в сравнение с общата средна специфична скорост на растеж може да е показател за латентна фаза. Докато латентната фаза може да се сведе до минимум и практически да се елиминира в контролните култури чрез правилното размножаване на предварителна култура, латентната фаза в експонираната култура може да е индикатор за възстановяване след първоначален токсичен стрес или намалена експозиция поради загуба на изпитван химикал (включително сорбция върху биомасата на водораслите) след първоначалната експозиция. От тук следва, че скоростта на растеж по сектори може да се оцени, за да се направи оценка на въздействията на изпитвания химикал, които възникват при процеса на експозиция. Значителните различия между скоростта на растеж по сектори и средната скорост на растеж показват, че има отклонение от постоянния експоненциален растеж, както и основание за внимателна проверка на кривите на растежа.
50. Процентното потискане на скоростта на растежа за всяка третирана повторна проба се изчислява от уравнението [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100 \quad [2],$$

където:

$\% I_r$ = процентно потискане в средната специфична скорост на растеж;

μ_c = средна стойност за средната специфична скорост на растеж (μ) в контролната група;

μ_T = средна специфична скорост на растеж за третираното повторение.

51. Когато за приготвянето на изпитваните разтвори се използват разтворители, за изчисляването на процентното потискане следва да се използват контролните проби на разтворителите, а не контролните проби без разтворители.

Добив

52. Добивът се изчислява като биомасата в края на изпитването минус началната биомаса за всеки отделен съд с контролни проби и с третирана проби. За всяка изпитвана концентрация и контрола се изчислява средната стойност на добива, заедно с оценките на дисперсията. Процентното потискане на добива ($\% I_y$) може да се изчисли за всяко третирано повторение, както следва:

▼ **M6**

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \quad [3]$$

където:

$\% I_y$ = процентно потискане на добива;

Y_c = средна стойност за добива в контролната група;

Y_T = стойност на добива в третираното повторение.

Построяване на кривата концентрация-отклик

53. Нанася се процентът на потискане като функция на логаритъма на концентрацията на изпитвания химикал и внимателно се проверява графиката, като не се отчитат точките с данни, които са отхвърлени в първата фаза като стойности, силно различаващи се от нормалните. Прекарарва се гладка линия през точките с данни на око или чрез компютърна интерполация, за да се получи първо впечатление за съотношението концентрация-отклик, а след това се продължава, като се прилага по-подробен метод, за предпочитане компютризиран статистически метод. В зависимост от предназначението на данните; качеството (прецизността) и количеството на данните, както и наличието на инструменти за анализ на данни, може да се реши (и понякога е добре обосновано) на този етап анализът на данните да се прекрати и просто да се отчетат ключовите величини EC_{50} и EC_{10} (и/или EC_{20}) от нанесената на око крива (вж. също раздела по-долу относно стимулиращите въздействия). Обоснованите причини да не се използва статистически метод може да включват:

— данните не са подходящи за компютризирани методи, чрез които да се дадат по-надеждни резултати от онези, които могат да се получат чрез експертна оценка — в такива ситуации някои компютърни програми може дори да не дадат надеждно решение (итерациите може да не водят до решение и др.)

— Отклиците при стимулиран растеж не могат да се обработят адекватно с използване на наличните компютърни програми (вж. по-долу).

Статистически процедури

54. Целта е да се получи количествено съотношение концентрация-отклик чрез регресионен анализ. Може да се използва претеглена линейна регресия след извършване на линеаризираща трансформация на данните от отклика — например в пробит, или логит, или Вейбул единици (8), но предпочитаните процедури са тези на нелинейната регресия, които по-добре обработват неизбежните неравномерности и отклонения от гладките разпределения. При приближаване на нула или пълно инхибиране подобни неравномерности може да бъдат увеличени от трансформацията, като по този начин пречат на анализа (8). Следва да се отбележи, че стандартните методи на анализ с помощта на пробит, логит или Вейбул трансформации са предназначени за използване при двоични данни (например смъртност или преживяване) и трябва да бъдат изменени, за да се приспособят към данните за растежа или биомасата. Специфични процедури за определяне на стойности на EC_x от непрекъснати данни могат да се намерят в (9), (10) и (11). Използването на нелинеен регресионен анализ е допълнително описано в допълнение 5.
55. За анализа на всяка от зависимите променливи се използва съотношението концентрация-отклик, за да се изчислят точковите оценки на стойностите на EC_x . По възможност трябва да се определят 95 % доверителни граници за всяка от оценките. Съгласието на данните от отклика с регресионния модел следва да се оцени графично или статистически. Регресионният анализ трябва да се извърши, като се използват отклиците при индивидуалните повторения, а не средните стойности за групите от третиранни проби. Ако обаче изглеждането на

▼ **M6**

нелинейната крива е трудно или несполучливо поради твърде голямото разсейване в данните, проблемът може да се заобиколи чрез извършване на регресия върху груповите средни стойности като практичен начин за намаляване на влиянието на предполагаемите стойности, силно различаващи се от нормалните. Използването на тази възможност следва да се отбележи в протокола от изпитването като отклонение от нормалната процедура, тъй като изглаждането на кривата с индивидуални повторения не е дало добър резултат.

56. Оценките на EC_{50} и доверителните граници могат да се получат също и чрез използване на линейна интерполация с bootstrap процедура (13), ако наличните регресионни модели/методи са неподходящи за данните.
57. За оценяването на LOEC, и следователно на NOEC, и за въздействието на изпитвания химикал върху скоростта на растеж е необходимо да се сравнят средните стойности на третираните проби като се използват техниките на дисперсионния анализ (ANOVA). Средната стойност за всяка концентрация след това трябва да се сравни със средната стойност на контролна проба с помощта на съответния метод за множествени сравнения или трендов тест. Тестовите на Дънет или на Уилямс могат да бъдат от полза (12)(14)(15)(16)(17). Необходимо е да се оцени дали е удовлетворено допускането при ANOVA за хомогенност на дисперсията. Тази оценка може да се извърши графично или чрез формален тест (17). Подходящи са тестовите на Левин или на Бартлет. Невъзможността за удовлетворяване на допускането за хомогенност на дисперсиите понякога може да се коригира чрез логаритмична трансформация на данните. Ако хетерогенността на дисперсията е екстремална и не може да се коригира чрез трансформация, следва да се обмисли анализ с методи като теста на Йонкхере за определяне на тренд със стъпка назад. Допълнителни насоки относно определянето на NOEC могат да се намерят в (11).
58. В най-новите научни разработки е дадена препоръка концепцията за NOEC да бъде изоставена и заменена с базирани на регресия точкови оценки на EC_x . Не е установена подходящата стойност на x за това изпитване на водорасли. Изглежда, че диапазонът от 10 до 20 % е подходящ (в зависимост от избраната зависима променлива) и се предпочита да бъде отчетена както EC_{10} , така и EC_{20} .

Стимулиране на растежа

59. Понякога се наблюдава стимулиране на растежа (отрицателно потискане) при ниски концентрации. Това може да е резултат от хормезис („токсична стимулация“) или от добавянето на стимулиращи растежа фактори с изпитвания материал към използваната минимална среда. Да се има предвид, че добавянето на неорганични хранителни вещества не би трябвало да има пряко въздействие, защото изпитваната среда следва да поддържа излишък от хранителни вещества през цялото време на изпитването. Обикновено стимулацията при ниска доза може да се пренебрегне при изчисляването на EC_{50} , освен ако не е екстремална. При все това, ако е екстремална или ако трябва да се изчисли стойността на EC_x за ниско x , може да са необходими специални процедури. Ако е възможно, от анализа на данните следва да се избягва изключване на отклици, показващи стимулация, а ако наличният софтуер за изглаждане на криви не може да приеме незначителна стимулация, може да се използва линейна интерполация с bootstrap процедура. Ако стимулацията е екстремална, може да се обмисли използване на модел с хормезис (18).

Нетоксично потискане на растежа

60. Поглъщащите светлина изпитвани материали могат да предизвикат намаляване на скоростта на растежа, тъй като засенчването намалява количеството налична светлина. Такива въздействия от физическо естество следва да бъдат отделени от токсичните въздействия чрез изменение на условията на изпитването, като въздействията от физическо естество следва да се отчитат отделно. Насоки могат да се намерят в (2) и (3).

ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

61. В протокола от изпитването се включва следното:

▼ M6*Изпитван химикал:*

- физична природа и съответни физични и химични свойства, включително граница на разтворимост във вода;
- данни за химичната идентификация (например CAS номер), включително чистота (онечиствания).

Изпитван биологичен вид:

- щам, доставчик или източник и използваните условия за културата.

Условия на изпитване:

- дата на началото на изпитването и неговата продължителност;
- описание на плана на изпитването: съдове за изпитването, обеми на културите, плътност на биомасата в началото на изпитването;
- състав на средата;
- изпитвани концентрации и повторения (например брой на повторенията, брой на изпитваните концентрации и използваната геометрична прогресия);
- описание на подготвянето на изпитваните разтвори, включително използването на разтворители и др.
- апаратура за култивиране;
- интензитет и качество на светлината (източник, хомогенност);
- температура;
- изпитвани концентрации: номиналните изпитвани концентрации и всички резултати от анализи за определяне на концентрацията на изпитвания химикал в съдовете за изпитване. Следва да се отчете коефициентът на аналитичния добив на метода и границата на количественото определяне в изпитваната матрица;
- всички отклонения от настоящия метод за изпитване;
- метод за определянето на биомасата и доказателство за корелация между измерения параметър и сухото тегло;

Резултати:

- стойности на рН в началото и в края на изпитването при всички третираны проби;
- биомасата за всяка колба при всяка точка на измерване и метод за измерване на биомасата;
- криви на растеж (графика на биомасата в зависимост от времето);
- изчислените зависими променливи за всяко третирано повторение, със средни стойности и коефициент на вариация за повторенията;
- графично представяне на съотношението концентрация/ефект;

▼ **M6**

- оценки на токсичността за зависимите променливи, например EC_{50} , EC_{10} , EC_{20} и свързаните доверителни интервали. Ако са изчислени — LOEC и NOEC, както и статистическите методи за тяхното определяне;
- ако е използван ANOVA, мащабът на въздействието, което може да се открие (например най-малката значима разлика);
- всяка стимулация на растеж, открита в която и да е третирана проба;
- всички други наблюдавани ефекти, например морфологични изменения във водораслите;
- обсъждане на резултатите, включително всякакво влияние върху резултата от изпитването, вследствие на отклонения от настоящия метод за изпитване.

ЛИТЕРАТУРА

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

▼ M6

- (12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121
- (13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
- (14) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
- (15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
- (16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519-531.
- (17) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley, New York.
- (18) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼ **M6***Допълнение 1***Определения**

За целите на настоящия метод за изпитване се използват следните определения и съкращения:

Биомаса е сухото тегло от жива материя, присъстваща в дадена популация, изразено посредством определен обем; например mg водорасли/литър изпитван разтвор. Обикновено „биомаса“ се определя като маса, но в настоящото изпитване думата се използва за маса за обем. Също така в настоящото изпитване сурогатите на биомаса, например брой клетки, флуоресценция и т.н., се измерват по принцип и следователно употребата на термина „биомаса“ се отнася и до измерванията на тези сурогати.

Химикал означава вещество или смес.

Коефициент на вариация е безразмерна мярка на варирането на параметър, определен като отношението на стандартното отклонение към средната стойност. Той също така може да бъде изразен като процентна стойност. Средният коефициент на вариация на средната специфична скорост на растеж в повторенията от контролни култури се изчислява, както следва:

1. Изчисляване на % CV на средната специфична скорост на растеж от дневните скорости на растеж/скоростите на растеж по сектори за съответното повторение;
2. Изчисляване на средната стойност на всички стойности, изчислени в точка 1, за да се получи средният коефициент на вариация на дневната специфична скорост на растеж/специфична скорост на растеж по сектори в повторенията от контролни култури.

ES_x е концентрацията на изпитвания химикал, разтворен в изпитваната среда, която води до x % (например 50 %) намаляване на растежа на изпитвания организъм в рамките на определен период на експозиция (който трябва да бъде посочен изрично, ако се отклонява от пълната или нормалната продължителност на изпитването). С оглед на еднозначно обозначаване на стойността на ES, изведена от скоростта на растежа или от добива, символът „E_rC“ се използва за скоростта на растежа, а „E_yC“ се използва за добива.

Среда на растеж е напълно синтетичната среда за отглеждане, в която растат изпитваните водорасли, когато са изложени на изпитвания химикал. Изпитваният химикал обикновено се разтваря в изпитваната среда.

Скорост на растеж (средна специфична скорост на растеж) е логаритмичното нарастване на биомасата през периода на експозиция.

Най-ниска концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC) е най-ниската изпитвана концентрация, при която за химикала се наблюдава статистически значимо въздействие за забавяне на растежа (при $p < 0,05$) в сравнение с контролната проба, в рамките на дадено време на експозиция. При все това, всички изпитвани концентрации над LOEC трябва да имат вредно въздействие, равно или по-голямо от наблюдаваното при LOEC. Когато тези две условия не могат да бъдат удовлетворени, трябва да се даде пълно обяснение за това как е била избрана LOEC (и следователно NOEC).

Концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC) е изпитваната концентрация непосредствено под LOEC.

Зависима променлива е променлива за оценяване на токсичността, получена от измерваните параметри, описваща биомасата чрез различни методи на изчисление. За този метод скоростите на растеж и добив са зависими променливи, получени от прякото измерване на биомаса или който и да е от посочените сурогати.

▼ **M6**

Специфична скорост на растеж е зависима променлива, определена като частното на разликата на естествените логаритми на наблюдаван параметър (биомаса в настоящия метод за изпитване) и съответния период от време.

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

Добив е стойността на измерваната променлива в края на периода на експозиция минус стойността на измерваната променлива в началото на периода на експозиция, която изразява увеличаването на биомасата по време на изпитването.

▼ M6*Допълнение 2***Щамове, за които е демонстрирана пригодност за изпитването****Зелени водорасли**

Pseudokirchneriella subcapitata (известни преди като *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (известни преди като *Scenedesmus subspicatus*)
86.81 SAG

Диатомеи

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Цианобактерии

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Източници на щамове

Препоръчаните щамове са налични в едновидови водораслови култури от следните колекции (по азбучен ред):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
USA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Ambleside
Cumbria LA22 0LP
UK

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
D-37073 Göttingen
GERMANY

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA.

▼ **M6****Външен вид и характеристики на препоръваните видове**

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Външен вид	Извити, усукани единични клетки	Овални, повечето единични клетки	Пръчици	Вериги от овални клетки	Пръчици
Размери (L × W) µm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Клетъчен обем (µm ³ /клетка)	40-60 ⁽¹⁾	60-80 ⁽¹⁾	40-50 ⁽¹⁾	30-40 ⁽¹⁾	2,5 ⁽²⁾
Сухо тегло на клетката (mg/клетка)	2-3 × 10 ⁻⁸	3-4 × 10 ⁻⁸	3-4 × 10 ⁻⁸	1-2 × 10 ⁻⁸	2-3 × 10 ⁻⁹
Скорост на растеж ⁽³⁾ (ден ⁻¹)	1,5-1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0-2,4

⁽¹⁾ Измерено с електронен брояч на частици

⁽²⁾ Изчислено от размерите

⁽³⁾ Най-често наблюдавана скорост на растеж в среда на ОИСП при интензитет на светлината приблизително 70 µE m⁻² s⁻¹ и 21 °C

Специфични препоръки за култивиране и работа с препоръчаните видове за изпитване***Pseudokirchneriella subcapitata* u *Desmodesmus subspicatus***

Тези зелени водорасли като цяло се поддържат лесно в различни среди за култури. Информацията относно подходящите среди е налична от колекциите с култури. Клетките обикновено са единични и измерването на плътността на клетките може лесно да се извърши с помощта на електронен брояч на частици или микроскоп.

Anabaena flos-aquae

Може да се използват различни среди за отглеждане при съхраняването на изходната култура. Особено важно е да се избягва възможността периодичната култура да прескочи логаритмичната фаза на растеж при обновяване; аналитичният добив на този етап е затруднен.

Anabaena flos-aquae развива агрегати от свързани помежду си вериги от клетки. Размерите на тези агрегати може да варират в зависимост от условията за култивиране. Може да е необходимо тези агрегати да се прекъснат при преброяване с микроскоп или електронен брояч на частици за определяне на биомасата.

Може да се използва сонификация на подпробите за прекъсване на веригите, за да се намали варирането при преброяването. По-дългата сонификация от необходимата за накъсването на веригите, за да станат те с по-малка дължина, може да разруши клетките. Интензивността на сонификацията и нейната продължителност трябва да са идентични за всяка третирана проба.

Преброяват се достатъчно полета върху хемцитометъра (най-малко 400 клетки), за компенсиране на варирането. Това ще подобри надеждността на определянето на плътността с микроскоп.

Може да се използва електронен брояч на частици за определяне на общия обем на клетките на *Anabaena* след прекъсването на клетъчните вериги чрез внимателна сонификация. Енергията на сонификацията трябва да се коригира, за да се избегне разрушаването на клетките.

Използва се вихров смесител или подобен подходящ метод, за да се гарантира, че суспензията от водорасли, използвана за инокулиране на съдовете за изпитване, е добре разбъркана и хомогенна.

▼ M6

Съдовете за изпитване следва да се поставят върху въртяща се кръгова или възвратно-постъпателна клатачна машина при около 150 оборота в минута. Алтернативно може да се използва периодично разбъркване за намаляване на тенденцията при *Anabaena* да образува бучки. Ако се получи образуване на бучки, трябва да се внимава да се вземат представителни проби за измервания на биомасата. Може да е необходимо енергично разбъркване за раздробяване на бучките от водорасли преди вземането на проби.

Synechococcus leopoliensis

Може да се използват различни среди на растеж при съхраняването на изходната култура. Информация относно подходящите среди е налична от колекциите с култури.

Synechococcus leopoliensis расте като единични пръчковидни клетки. Клетките са много малки, което усложнява използването на броене с микроскоп за измервания на биомасата. От полза са електронни броячи на частици, оборудвани за броене на частици до размери от приблизително 1 µm. Флуорометрични измервания *in vitro* също са приложими.

Navicula pelliculosa

Може да се използват различни среди на растеж при съхраняването на изходната култура. Информация относно подходящите среди е налична от колекциите с култури. Отбележете, че в средата е нужен силикат.

Navicula pelliculosa може да образува агрегати при определени условия за отглеждане. Поради производството на липиди, клетките на водораслите понякога проявяват тенденция за натрупване в повърхностния слой. При такива обстоятелства трябва да се предприемат специални мерки, когато се вземат подпроби за определяне на биомасата, за да се получат представителни проби. Може да е нужно енергично разбъркване, например с използване на вихров смесител.

▼ **M6**

Допълнение 3

Среда на растеж

Може да се използва една от следните две среди на растеж:

— Среда ОИСП: оригиналната среда на ОИСП TG 201, също съгласно ISO 8692

— US. EPA среда на ААР, също съгласно ASTM.

При приготвянето на тези среди следва да се използват реактиви или химикали с чистота „чист за анализ“, както и дейонизирана вода.

Състав на средата на ААР (US. EPA) и на средата на ОИСП TG 201.

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

Моларното отношение на ЕДТА към желязото с малко надхвърля единица. Това предотвратява утаяването на желязото и същевременно свежда до минимум хелатообразуването на йони на тежки метали.

При изпитването с диатомеята *Navicula pelliculosa* и към двете среди трябва да се добави Na₂SiO₃ · 9H₂O за получаване на концентрация от 1,4 mg Si/l.

▼ M6

Стойността на рН на средата се получава при равновесие между карбонатната система на средата и парциалното налягане на CO_2 в атмосферния въздух. Приблизителното съотношение между рН при 25 °С и моларната концентрация на бикарбоната е:

$$\text{pH}_{\text{eq}} = 11,30 + \log[\text{HCO}_3^-]$$

С 15 mg NaHCO_3/l , $\text{pH}_{\text{eq}} = 7,5$ (U.S. EPA среда) и с 50 mg NaHCO_3/l , $\text{pH}_{\text{eq}} = 8,1$ (среда ОИСП).

Елементен състав на изпитваните среди

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

Приготвяне на средата на ОИСП

Хранителна среда	Концентрация в изходния разтвор
Изходен разтвор 1: Макрохранителни вещества	
NH_4Cl	1,5 g/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Изходен разтвор 2: желязо	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64 mg/l
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l
Изходен разтвор 3: микроелементи	
H_3BO_3	185 mg/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 mg/l
ZnCl_2	3 mg/l

▼ **M6**

Хранителна среда	Концентрация в изходния разтвор
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg/l
Изходен разтвор 4: бикарбонат	
NaHCO_3	50 g/l
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	

Изходните разтвори се стерилизират чрез филтруване с мембрана (среден диаметър на порите 0,2 μm) или чрез автоклавиране (120 °C, 15 минути). Разтворите се съхраняват на тъмно при 4 °C.

Изходни разтвори 2 и 4 не се обработват в автоклав, а се стерилизират чрез филтруване с мембрана.

Пригответе средата на растеж чрез добавяне на съответния обем на изходни разтвори от 1 до 4 към вода:

Към 500 ml стерилизирана вода се добавя:

10 ml от изходен разтвор 1

1 ml от изходен разтвор 2

1 ml от изходен разтвор 3

1 ml от изходен разтвор 4

Допълва се до 1 000 ml със стерилизирана вода.

Оставя се достатъчно време за достигане на равновесие на средата с атмосферния CO_2 , при необходимост чрез барботиране със стерил филтруван въздух в течение на няколко часа.

Приготвяне на U.S. EPA средата

- Добавя се 1 ml от всеки изходен разтвор в 2.1–2.7 към приблизително 900 ml дейонизирана или дестилирана вода и след това се разрежда до 1 литър.
- Изходните разтвори с макрохрани се изготвят чрез разтваряне на следните съставки в 500 ml дейонизирана или дестилирана вода. Реактивите 2.1, 2.2, 2.3 и 2.4 могат да се комбинират в един изходен разтвор.

2.1	NaNO_3	12,750 g.
2.2	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6,082 g.
2.3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,205 g.
2.4	Изходен разтвор с микрохрани (вижте 3).	
2.5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,350 g.
2.6	K_2HPO_4	0,522 g.
2.7	NaHCO_3	7,500 g.
2.8	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Вж. Забележка 1.

▼ **M6**

Забележка 1: Използва се само за изпитване на диатомеи. Може да се добавят директно (202,4 mg) или във вид на изходен разтвор за получаването на крайна концентрация в средата от 20 mg/l Si.

3. Изходният разтвор с микрохрани се прави чрез разтваряне на следните съставки в 500 ml дейонизирана или дестилирана вода:
 - 3.1 H_3BO_3 92,760 mg.
 - 3.2 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 207,690 mg.
 - 3.3 ZnCl_2 1,635 mg.
 - 3.4 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 79,880 mg.
 - 3.5 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,714 mg.
 - 3.6 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,630 mg.
 - 3.7 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,006 mg.
 - 3.8 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 150,000 mg. [Динатриев (етилендинитрило) тетраацетат].
 - 3.9 $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,005 mg вижте Забележка 2.

Забележка 2: Използва се само в среда за изходни култури на видове диатомеи.

4. Регулира се рН до $7,5 \pm 0,1$ с 0,1 N или 1,0 N NaOH или HCl.
5. Средите се филтруват в стерилен контейнер през 0,22 μm мембранен филтър, ако ще се използва брояч на частици, или през 0,45 μm филтър, ако няма да се използва брояч на частици.
6. Средата се съхранява на тъмно при приблизително 4 °C до влизане в употреба.

▼ M6*Допълнение 4***Примерна процедура за култивиране на водорасли****Общи наблюдения**

Целта на култивирането въз основа на следната процедура е да се получат култури на водорасли за изпитвания на токсичност.

Трябва да се използват подходящи методи, за да се гарантира, че културите на водорасли не са заразени с бактерии. Желателно е културите да са аксенни, но трябва да бъдат въведени и използвани едновидови водораслови култури.

Всички операции трябва да се извършват при стерилни условия, за да се избегне замърсяването с бактерии и други водорасли.

Оборудване и материали

Вж. в метод за изпитване: Апаратура.

Процедури за получаване на култури на водорасли*Приготвяне на хранителни разтвори (среду):*

Всички хранителни соли на средата се приготвят като концентрирани изходни разтвори и се съхраняват на тъмно и хладно. Тези разтвори се стерилизират чрез филтруване или обработка в автоклав.

Средата се приготвя чрез добавяне на точното количество от изходния разтвор към стерилна дестилирана вода, като се внимава да не възникнат инфекции. За твърда среда се добавя 0,8 процента агар.

Изходна култура:

Изходните култури са малки култури на водорасли, които периодично се прехвърлят в прясна среда, за да играят ролята на първоначален материал за изпитване. Ако културите не се използват периодично, те се разполагат на ивици в наклонени епруветки с агар. Те се прехвърлят в прясна среда най-малко веднъж на всеки два месеца.

Изходните култури се отглеждат в конични колби, съдържащи подходящата среда (с обем около 100 ml). Когато водораслите се инкубират при 20 °C с непрекъснато осветяване, е необходимо прехвърляне всяка седмица.

При прехвърлянето известно количество от „старата“ култура се прехвърля със стерилни пипети в колба с прясна среда, така че при бързорастящите видове началната концентрация е около 100 пъти по-малка, отколкото при старата култура.

Скоростта на растеж на вида може да се определи от кривата на растежа. Ако тя е известна, възможно е да се оцени плътността, при която културата следва да се прехвърли в нова среда. Това трябва да се направи преди културата да достигне фазата на смърт.

Предкултура:

Предкултурата е предназначена да осигури известно количество водорасли, подходящи за инокулацията на култури за изпитване. Предкултурата се инкубира при условията на изпитването и се използва докато все още расте експоненциално, обикновено след инкубационен период от 2 до 4 дни. Когато културите на водорасли съдържат деформирани или анормални клетки, те трябва да се изхвърлят.

▼ **M6***Допълнение 5***Анализ на данните чрез нелинейна регресия****Общи съображения**

Откликът при изпитването на водорасли и други изпитвания за микробен растеж (растежът на биомасата) по своя характер е непрекъсната или метрична променлива — скоростта на процеса, ако се използва скоростта на растеж, и нейният интеграл по времето, ако е избрана биомасата. И двете се отнасят към съответния среден отклик на неекспонирани повторни контролни проби, които показват максимален отклик при наложените условия — със светлината и температурата като основни определящи фактори при изпитването на водорасли. Системата е разпределена или хомогенна и биомасата може да се разглежда като континуум, без да се вземат предвид отделните клетки. Разпределението на дисперсията на типа отклик при такава система е свързано единствено с експериментални фактори (типично описвано чрез логнормално или нормално разпределение на грешката). Това контрастира с типичните отклици при биологични изследвания с двоични данни, за които допустимата грешка (обикновено с биномно разпределение) на отделните организми често се приема за доминиращата компонента на дисперсията. Откликите на контролните проби тук са равни на нула или на фоново равнище.

В неусложнените ситуации нормализираният или относителният отклик, γ , намалява монотонно от 1 (нулево потискане) до 0 (100-процентно потискане). Отбележете, че за всички отклици е налице съответна грешка и че очевидно отрицателни потискания могат да се изчисляват като резултат само от случайна грешка.

Регресионен анализ*Модели*

Регресионният анализ има за цел да опише количествено кривата концентрация-отклик във формата на математическа регресионна функция $Y = f(C)$ или по-често $F(Z)$, където $Z = \log C$. Използването на обратната функционална зависимост $C = f^{-1}(Y)$ позволява да се изчислят стойностите за EC_x , включително EC_{50} , EC_{10} и EC_{20} , както и техните 95 % доверителни граници. Няколко прости математически функционални форми са се доказали като успешно описващи съотношенията концентрация-отклик, получени при изпитванията за потискане растежа на водорасли. Функциите включват например логистичното уравнение, несиметричното разпределение на Вейбул и функцията на логнормалното разпределение, всички от които са сигмоидни криви, асимптотично клонящи към нула за $C \rightarrow 0$ и към единица за $C \rightarrow$ безкрайност.

Използването на модели с непрекъсната прагова функция (например моделът на Койман „за потискане на растежа на популация“ — Koopman et al., 1996 г.) е предложено наскоро или се приема като алтернатива на асимптотичните модели. Този модел предполага липсата на ефекти при концентрации под определен праг, EC_0^+ , който се оценява чрез екстраполация на съотношението концентрация-отклик до пресичането с оста на концентрацията с помощта на проста непрекъсната функция, която не е диференцируема в началната точка.

Следва да се обърне внимание, че анализът може да бъде просто минимизиран на суми от квадрати на остатъци (при допускане за постоянна дисперсия) или претеглени квадрати, ако хетерогенността на дисперсията е компенсирана.

Процедура

Процедурата може да се опише както следва: избира се подходящо функционално уравнение, $Y = f(C)$ и се съгласува с данните чрез нелинейна регресия. За предпочитане е да се използват измерванията от всяка отделна колба, а не средните стойности на повторенията, за да се извлече колкото е възможно повече информация от данните. От друга страна, ако дисперсията е голяма, практическят опит сочи, че средните

▼ **M6**

стойности на повторенията могат да доведат до по-устойчива математическа оценка, по-слабо повлияна от систематични грешки в данните, в сравнение със запазването на всяка отделна точка с данни.

Построява се съгласуваната крива и измерените данни и се проверява дали съгласуването на кривата е подходящо. Анализът на остатъци може да е особено полезен инструмент за тази цел. Ако избраната функционална зависимост за съгласуване на отношението концентрация-отклик не описва добре цялата крива или съществена част от нея, като например отклика при ниски концентрации, се избира друга възможност за съгласуване на кривата — например несиметрична крива като функцията на Вейбул, вместо симетрична. Отрицателните потискания могат да представляват проблем, например при функцията на логнормално разпределение, което също изисква алтернативна регресионна функция. Не се препоръчва да се присвоява стойност нула или малка положителна стойност на такива отрицателни стойности, защото това изкривява разпределението на грешките. Може да е подходящо да се правят отделни изглаждания на кривата към части от кривата, като например частта на слабо потискане, за да се оценят стойностите за EC_{10wx} . От изгладеното уравнение се изчислява (чрез „оценка на инверсната функция“ $C = f^{-1}(Y)$) EC_x на характерните точкови оценки и се отчитат най-малко оценките за EC_{50} и една или две оценки за $EC_{low\ x}$. Опитът от практическите изпитвания е показал, че прецизността на изпитването на водорасли обикновено позволява достатъчно точна оценка при 10 % ниво на потискане, ако точките с данни са достатъчно — освен ако не възникне стимулиране при ниски концентрации като фактор за смесване на ефектите. Прецизността на оценката за EC_{20} често е значително по-добра от тази на EC_{10} , защото EC_{20} обикновено е разположена приблизително върху линейната част от централната крива концентрация-отклик. Понякога може да е трудно да се тълкува EC_{10} поради стимулацията на растежа. Така че докато EC_{10} обикновено се получава с достатъчна точност, препоръчително е да се отчита винаги и EC_{20} .

Тегловни коефициенти

Експерименталната дисперсия в общия случай не е постоянна и обичайно включва пропорционален компонент, и следователно в този случай има благоприятни условия за редовно извършване на претеглена регресия. При такъв анализ обикновено се приема, че тегловните коефициенти са обратнопропорционални на дисперсията:

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

Много програми за регресия дават възможност за извършване на претеглена регресия с тегловни коефициенти, изброени в таблица. За удобство, тегловните коефициенти следва да се нормализират, като се умножат с $n/\Sigma w_i$ (n е броят на точките с данни), така че тяхната сума да е равна на единица.

Нормализиране на отклиците

Нормализирането чрез средните стойности на отклиците от контролните проби създава някои принципни проблеми и води до твърде усложнена структура на дисперсията. При разделянето на отклиците на средната стойност на отклика на контролната проба, с оглед получаване на процента на потискане, се внася допълнителна грешка, предизвикана от грешката в средната стойност на контролната проба. Освен ако тази грешка не е пренебрежимо малка, тегловните коефициенти за регресията и доверителните граници трябва да бъдат коригирани за ковариацията с контролната проба (Draper and Smith, 1981). Трябва да се има предвид, че високата прецизност на оценяваната средна стойност за отклика на контролната проба е важна при свеждането до минимум на цялостната дисперсия за относителния отклик. Тази дисперсия е следната:

(индексът i се отнася за нивото i на концентрацията, а индексът 0 — за контролните проби)

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

▼ **M6**

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

и тъй като $(\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0$ и $(\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$

с нормално разпределени данни и m_i и m_0 повторения: $\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$

общата дисперсия на относителния отклик Y_i следователно става:

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

Грешката при средната стойност на контролна проба е обратнопропорционална на квадратния корен от броя на осреднените стойности на повторните контролни проби и в някои случаи може да е обосновано включването на данни за минали периоди, с което в голяма степен да се намали грешката. Алтернативна процедура е данните да не се нормализират и да се изгледят абсолютните отклици, включително данните от отклиците на контролните проби, но като се въведе стойността на отклика на контролната проба като допълнителен параметър, който да бъде изгледен чрез нелинейна регресия. При използване на обикновено регресионно уравнение с два параметъра този метод изисква изглаждане на три параметъра и следователно се нуждае от повече точки с данни от нелинейната регресия върху данни, които се нормализират с помощта на предварително зададен отклик от контролна проба.

Обратни доверителни интервали

Изчисляването на доверителните интервали при нелинейна регресия чрез обратна оценка е доста сложно и не е налична стандартна възможност в обикновените пакети от статистически компютърни програми. Приблизителни доверителни граници могат да бъдат получени със стандартни програми за нелинейна регресия с репараметризация (Bruce and Versteeg, 1992), което включва повторно съставяне на математическото уравнение с желаните точкови оценки, например EC_{10} и EC_{50} като параметри, които ще се оценяват. (Нека функцията е $I = f(\alpha, \beta, \text{концентрация})$ и като използваме съотношенията по определение $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0,1$ и $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0,5$ да заместим $f(\alpha, \beta, \text{концентрация})$ с еквивалентна функция $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{концентрация})$).

По-директно изчисляване (Andersen et al, 1998) се извършва чрез запазване на оригиналното уравнение и използване на разлагането на Тейлър около средните стойности на r_i и r_0 .

Напоследък станаха популярни „bootstrap“ методите. Тези методи използват измерените данни и често вземане на повторни извадки, насочвано чрез генератор на случайни числа, за оценка на разпределението на емпиричната дисперсия.

ЛИТЕРАТУРА

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

Draper, N.R. and Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley, New York.

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

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

▼B**В.4. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПРЯКАТА БИОЛОГИЧНА РАЗГРАДИМОСТ****ЧАСТ I. ОБЩИ СЪОБРАЖЕНИЯ****I.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Описани са шест метода, които позволяват скрининг на химични вещества за пряка биологична разградимост в аеробна водна среда:

- а) Метод за определяне на разтворен органичен въглерод (DOC) чрез скоростта на отмиране (метод В.4-А)
- б) Модифициран скрининг метод на OECD за определяне на DOC чрез скоростта на отмиране (метод В.4-Б)
- в) Метод за отделяне на въглероден диоксид (CO₂) (модифициран метод на Щурм) (метод В.4-В)
- г) Манометрична респирометрия (метод В.4-Г)
- д) Метод на изолираните проби (метод В.4-Д)
- е) МПТ (Министерство на международната търговия и индустрията — Япония) (метод В.4-Е)

Общите положения за всичките шест изпитвания са дадени в част I на метода. Специфичните детайли за отделните методи са дадени в части II—VII. Приложенията съдържат определения, формули и указателен материал.

Едно междулабораторно сравнително изпитване, проведено от OECD през 1988 г., показва, че методите дават съвместими резултати. Един или друг от методите обаче може да бъде предпочетен в зависимост от физичните характеристики на изпитваното вещество.

I.2. ИЗБОР НА ПОДХОДЯЩИЯ МЕТОД

За да се избере най-подходящият метод, е необходима информация за разтворимостта, парното налягане и адсорбционните характеристики на химичното вещество. Следва да се известни химичната структура и формулата, за да се изчисляват теоретичните стойности и/или да се проверяват измерените стойности на параметрите, например ThOD, ThCO₂, DOC, TOC, COD (вж. приложения I и II).

Изпитваните химични вещества, които са разтворими във вода до не по-малко от 100 mg/l, могат да бъдат оценявани чрез всички методи, при положение че не са летливи и не се адсорбират. За онези химични вещества, които са трудно разтворими във вода, летливи или адсорбиращи се, подходящите методи са показани в таблица 1. Начинът, по който се работи с трудно разтворими във вода и летливи химични вещества, е описан в приложение III. Умерено летливите химични вещества могат да се изпитват по метода за определяне на органичен въглерод (DOC) чрез скоростта на отмиране, ако има достатъчно въздушно пространство в съдовете (които следва да са подходящо затворени). В този случай следва да се постави и абиотична контрола, за да се вземат под внимание всички физични загуби.



Таблица 1

Приложимост на методите за изпитване

Изпитване	Аналитичен метод	Подходящ за вещества, които са:		
		трудно разтворими	летливи	адсорбиращи се
Определяне на разтворен органичен въглерод чрез скоростта на отмиране	Разтворен органичен въглерод	—	—	+/-
Модифициран метод на OECD за определяне чрез скоростта на отмиране	Разтворен органичен въглерод	—	—	+/-
Метод с отделяне на CO ₂	Респиromетрия: отделяне на CO ₂	+	—	+
Манометрична респиromетрия	Манометрична респиromетрия: потребление на кислород	+	+/-	+
Метод на изолираните проби	Респиromетрия: разтворен кислород	+/-	+	+
MIT	Респиromетрия: потребление на кислород	+	+/-	+

При тълкуването на получените резултати е необходима информация за чистотата или относителните дялове на основните компоненти на изпитвания материал, особено когато резултатите са ниски или гранични.

Информацията за токсичността на химичното вещество спрямо бактерии (приложение IV) може да бъде особено полезна при избирането на подходящи концентрации за изпитване и може да бъде особено важна за правилното тълкуване при ниски стойности на биологичното разграждане.

I.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

За да се провери процедурата, веществата за сравнение, които изпълняват критериите за биоразградимост, се изпитват чрез поставяне в съответна колба, успоредно на хода на нормалното изпитване.

Подходящи химични вещества са анилин (прясно дестилиран), натриев ацетат и натриев бензоат. Всички тези сравнителни вещества се разграждат по изброените методи, дори когато нарочно не е добавен инокулант.

Смята се, че следва да се търси сравнително вещество, което е лесно биоразградимо, но изисква прибавяне на инокулант. Предлаган е калиев хидрогенфталат, но са необходими повече доказателства за това вещество, за да може да бъде прието като сравнително.

При респиromетричните изпитвания азот-съдържащите съединения могат да повлияват върху потреблението на кислород поради нитрификацията (виж приложения II и IV).

I.4. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДИТЕ ЗА ИЗПИТВАНЕ

Разтвор или суспензия на изпитваното вещество в минерална среда се инокулира и се инкубира при аеробни условия на тъмно или при дифузна светлина. Количеството на DOC в изпитвания разтвор, дължащо се на инокуланта, следва да се поддържа колкото може по-ниско в сравнение с количеството на DOC, дължащо се на изпитваното вещество. Ендогенната активност на инокуланта се отчита чрез залагане на контролна проба с инокулант, но без изпитваното вещество, въпреки че ендогенната активност на клетките в присъствие на веществото няма да съвпадне точно с ендогенната контрола. Успоредно се залага и вещество за сравнение, за да се провери протичането на процедурите.

▼B

Най-общо разграждането се проследява чрез определяне на параметри, като DOC, продукция на CO₂ и потребление на кислород, като измерванията се правят на достатъчно чести интервали, за да може да се отчетат началото и края на биоразграждането. С автоматични респирометри измерванията са непрекъснати. DOC понякога се измерва като допълнение на други параметри, но това обикновено се прави само в началото и в края на изпитването. Може да се използва и специфичен химичен анализ, за да се оцени първоначалното разграждане на изпитваното вещество и да се определи концентрацията на всички образувани междинни вещества (задължително при изпитването по MITI).

Нормално изпитването продължава 28 дни. Изпитванията могат да завършат и преди 28 дни, т.е. тогава, когато кривата на биологичното разграждане е достигнала плато при поне 3 определения. Изпитванията могат да продължат и повече от 28 дни, когато кривата показва, че биоразграждането е започнало, но платото не е достигнато за 28 дни.

I.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО**I.5.1. Възпроизводимост**

Поради природата на биоразграждането и смесените бактериални популации, използвани като инокулант, определянето следва да се прави най-малко в две повторения.

От опит се знае, че колкото по-високи концентрации микроорганизми се прибавят първоначално към изпитваната среда, толкова по-малки са разликите между повторенията. Кръгови (междулабораторни) изпитвания са показали също така, че може да има големи различия в резултатите, получени от различни лаборатории, но нормално се получава добро съвпадение при лесно биоразградими съединения.

I.5.2. Валидност на изпитването

Едно изпитване се смята за валидно, ако при повторенията разликата между най-ниската и най-високата стойност при отстраняване на изпитваното химично вещество на платото в края на теста или в края на 10-дневен период е по-малка от 20 % и ако процентното разграждане на сравнителното вещество е достигнало равнището на биоразграждане за 14 дни. Ако което и да е от тези условия не е изпълнено, изпитването следва да бъде повторено. Поради строгостта на методите ниските стойности не винаги означават, че изпитваното вещество не се разгражда в естествени условия, но показват, че е необходима повече работа, за да се установи биоразграждането.

Ако при едно изпитване за токсичност, съдържащо както изпитваното вещество, така и веществото за сравнение, се получи по-малко от 35 % разграждане (на основата на DOC) или по-малко от 25 % (на основата на ThOD или ThCO₂) за 14 дни, изпитваното вещество може да се приеме като инхибитор (вж. приложение IV). Тестовите серии следва да бъдат повторени, използвайки по възможност по-ниски концентрации на изпитваното вещество при по-висока концентрация на инокуланта, но не повече от 30 mg частици/литър.

I.6. ОБЩИ ПРОЦЕДУРИ И ПОДГОТОВКА

Общите условия, приложими към изпитванията, са обобщени в таблица 2. Апаратурата и другите експериментални условия, приложими специфично за всеки индивидуален тест, са описани по-долу под заглавието на съответния тест.



Таблица 2

Условия на изпитването

Изпитване	Определяне на DOC чрез скоростта на отмиране	Метод за отделяне на CO ₂	Манометрична респирометрия	Модифициран скрининг метод на OECD	Метод на изолирани те проби	MITI (1)
Концентрация на изпитваното вещество като mg/l mg DOC/l mg ThOD/l	10—40	10—20	100 50—100	10—40	2—10 5—10	100
Концентрация на инокуланта (в броя клетки/l, приблизително)	≤ 30 mg/l суспендирани частици или ≤ 100 ml отток (изходяща вторична вода)/l (10 ⁷ —10 ⁸)			0,5 ml вторичен отток/l (10 ⁵)	≤ 5ml отток/l (10 ⁴ —10 ⁶)	30 mg/l суспендиран и частици (10 ⁷ —10 ⁸)
Концентрация на елементите в минералната среда (в mg/l)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05—0,1				0,05—0,1	0,15
pH	7,4 + 0,2					За предпочитане 7.0
Температура	22 + 2 °C					25 + 1 °C
DOC = разтворен органичен въглерод ThOD = теоретично потребление на кислород SS = суспендирани частици						

I.6.1. Вода за разреждане

Използва се дестилирана или дейонизирана вода, несъдържаща инхибиращи концентрации на токсични вещества (например Си⁺⁺ йони). Водата трябва да съдържа не повече от 10 % от органичния въглерод, внесен с изпитвания материал. Високата чистота на водата за изпитването е необходима, за да се елиминират високи стойности на контролната проба. Замърсяването може да се дължи на присъщи онечиствания, а също така на йонообменните смоли и разграден материал от бактерии или водорасли. За всяка серия изпитвания се използва само една партия вода, предварително проверена чрез анализ за DOC. Такава проверка не е необходима при изпитването по метода на изолираните проби, но потреблението на кислород на водата трябва да е ниско.

▼B**I.6.2. Изходни разтвори на минерални компоненти**

За да се направят разтворите за изпитване, се приготвят изходни разтвори с определени концентрации на минералните компоненти. За методите: определяне на DOC чрез скоростта на отмиране, модифициран скрининг на ОИСП, отделяне на CO₂, манометрична респирометрия и този на изолираните проби могат да бъдат използвани описаните по-долу изходни разтвори (с различни фактори на разреждане).

Факторите на разреждане, а за изпитването по МПТ — и специфичното приготвяне на минералната среда, са дадени под заглавията на специфичните методи за изпитване.

Изходни разтвори:

Приготвят се следните изходни разтвори, като се използват химични вещества със степен ЧЗА („чист за анализ“).

- | | | |
|----|---|---------|
| а) | Монокалиев дихидрогенортофосфат, KН ₂ PO ₄ | 8,50 g |
| | Дикалиев монохидрогенортофосфат, K ₂ HPO ₄ | 21,75 g |
| | Динатриев монохидрогенортофосфат дихидрат, Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O | 33,40 g |
| | Амониев хлорид, NH ₄ Cl | 0,50 g |
| | Разтварят се във вода и се долива до 1 литър.
Стойността на рН на разтвора следва да бъде 7,4. | |
| б) | Калциев хлорид, безводен, CaCl ₂ | 27,50 g |
| | или калциев хлорид дихидрат, CaCl ₂ ·2H ₂ O | 36,40 g |
| | Разтварят се във вода и се долива до 1 литър. | |
| в) | Магнезиев сулфат хептахидрат, MgSO ₄ ·7H ₂ O | 22,50 g |
| | Разтваря се във вода и се долива до 1 литър. | |
| г) | железен(III) хлорид хексахидрат, FeCl ₃ ·6H ₂ O | 0,25g |
| | Разтваря се във вода и се долива до 1 литър. | |

Забележка: За да се избегне приготвянето на този разтвор непосредствено преди употреба, прибавя се една капка концентрирана HCl или 0,4 g динатриева сол на етилендиаминотетраоцетна киселина (EDTA) на литър.

I.6.3. Изходни разтвори на химични вещества

Например, разтварят се 1—10 g, както е подходящо, от изпитваното или сравнителното вещество в дейонизирана вода и се доливат до 1 l, ако разтворимостта превишава 1 g/l. В противен случай се приготвят изходните разтвори в минерална среда или веществото се добавя направо към минералната среда. При работа с по-малко разтворими химични вещества вижте приложение III, но при метода на МПТ (метод В.4-Е) не могат да се използват нито разтворители, нито емулгатори.

▼ B**I.6.4. Инокулант (култура от микроорганизми)**

Инокулантът може да произхожда от различни източници: активна утайка, пречистена отпадъчна вода (нехлорирана), повърхностни води и почви или смес от всичко това. Ако при методите за изпитване за определяне на DOC чрез скоростта на отмиране и при методите за отделяне на CO₂ и манометрична респирометрия се използва активна утайка, тя трябва да е взета от пречиствателна станция или от лабораторно звено, които получават предимно битови отпадъчни води. Опитът показва, че инокуланти от други източници дават по-голямо разсейване в резултатите. За изпитванията по модифицирания метод на ОИСП и метода на изолираните проби са необходими поразредени инокуланти без утаечни флокули и като източник се предпочита оттокът от градска станция за пречистване на отпадъчни води (ГСПОВ) или от лабораторно звено. За изпитването по метода на МПТ инокулантът се извлича от смесени източници, както е описано под заглавието на настоящото специфично изпитване.

I.6.4.1. Инокулант от активна утайка

Взема се свежа проба от активната утайка от басейна за аериране на една ГСПОВ или от лабораторно звено, които преработват предимно битови отпадъчни води. Ако е необходимо, се отстраняват твърдите частици чрез филтруване през фино сито и след това утайката се съхранява при аеробни условия.

Друга възможност е утайката да се остави да се утаи или да се центрофугира (например при 1100 g в продължение на 10 min) след премахване на по-грубите частици. Отдекантира се супернатантата. Утайката може да се промива с минерална среда. Концентрираната утайка се разрежда с минерална среда до концентрация 3—5 g суспендирани вещества на литър и се аерира, колкото се изисква.

Утайката трябва да се вземе от обикновена добре работеща пречиствателна станция. Ако утайката трябва да бъде взета от пречиствателна станция, работеща при висока скорост на обработка, или има съмнение, че съдържа инхибитори, тя трябва да се промие. Ресуспендираната утайка се утаява или центрофугира след разбъркване, отлива се супернатантата и промитата с нова минерална среда утайка отново се ресуспендира. Тази процедура се повтаря, докато се прецени, че утайката е свободна от странични вещества или инхибитор.

След достигане на пълно суспендиране или при необработена утайка, преди употреба се отделя проба за определяне на сухото тегло на суспендираните частици.

Друга възможност е да се хомогенизира активната утайка (3—5 g суспендирани частици/l). Утайката 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, а утайката се използва като посявка (инокулант) след 10-кратно разреждане в минерална среда.

I.6.4.2. Други източници на инокуланти

Инокулантите могат да произхождат от оттока на ГСПОВ или от лабораторно звено, получаващи предимно битови отпадъчни води. Взема се прясна проба и се съхранява при аеробни условия по време на транспортирането. Остава се да се утаи за 1 час или се филтрува през груб хартиен филтър, а отлятата течност или филтратът се запазват при аеробни условия, докато се изисква. От този тип култура могат да се използват до 100 ml на литър среда.

▼B

Друг един източник на инокулант са повърхностните води. В този случай се взема проба от подходяща повърхностна вода, например речна, езерна, и се съхранява при аеробни условия, докато се изисква. Ако е необходимо, инокулантът се концентрира чрез филтруване или центрофугиране.

I.6.5. Предварителна подготовка на микроорганизмите

Микроорганизмите могат да се адаптират предварително към условията на експеримента, но не и към изпитваното вещество. Предварителната подготовка се състои от аериране на активната утайка в минерална среда или в оттока в продължение на 5—7 дни при температурата на изпитването. Предварителната подготовка понякога подобрява точността на методите за изпитване чрез намаляване стойностите на контролната проба. Смята се, че е излишно посевките за метода на МПТ да се подготвят предварително.

I.6.6. Абиотични контроли

Когато се налага, се прави проверка за възможно абиотично разграждане на изпитваното вещество чрез определяне изразходването на DOC, потреблението на кислород или отделянето на въглероден диоксид в стерилни контроли, несъдържащи инокулант. Пробата се стерилизира чрез филтруване през мембранен филтър (0,2—0,45 µm) или чрез добавяне на подходящо токсично вещество в съответна концентрация. Ако се използва мембранна филтрация, пробите се взимат асептично, за да се поддържа стерилността. Ако не е предварително определена адсорбцията на изпитваното вещество, методите за изпитване, които измерват биоразграждането като изразходване на DOC, по-специално при инокуланти от активна утайка, следва да включват и абиотична контрола, която е посята с инокулант и отровена.

I.6.7. Брой на колбите

Броят на колбите при един типичен опит е описан под заглавието на всеки от методите за изпитване.

Могат да се използват следните видове колби:

- Суспензия за изпитване: съдържа изпитваното вещество и инокулант.
- Контролна проба за инокулант: съдържа само инокулант.
- Проба за контрол на процедурата: съдържа сравнителното вещество и инокулант.
- Проба за абиотичен стерилен контрол: стерилна, съдържа изпитвано вещество (вж. I.6.6).
- Проба за контрол на адсорбцията: съдържа изпитвано вещество, инокулант и стерилизиращ агент.
- Контрола за токсичност: съдържа изпитвано вещество, сравнително вещество и инокулант.

Задължително е определянето в изпитваната суспензия и в контролната проба за инокулант да се правят успоредно. Препоръчително е определянията и в другите колби да се изпълняват също така успоредно.

Това обаче не винаги е възможно. Трябва да се осигури вземане на достатъчно проби или отчитания, за да може да се позволи оценяването на процента на разграждане през 10-дневния период.

▼B**I.7. ДАННИ И ИЗЧИСЛЯВАНЕ**

При изчисляването на процентното разграждане D_t се използват средните стойности от измерване на две повторения на параметъра в съдовете за изпитване и в контролата за инокуланта. Формулите са разяснени по-долу в разделите за специфичните методи за изпитване. Ходът на разграждането се изрязва графично, като се отбелязва 10-дневният период. Изчислява се и се нанася в протокола достигнатият процент на разграждане в края на 10-дневния период и стойността при платото или в края на изпитването, което от двете е по-подходящо.

При респирометрични изпитвания азот-съдържащи съединения могат да повлияват потреблението на кислород поради нитрификацията (вж. приложения II и V).

I.7.1. Разграждане, измервано чрез определяне на разтворения органичен въглерод (DOC)

Процентът на разграждане D_t за всяко време, в което е взета една проба, трябва да се изчислява поотделно за колбите, съдържащи изпитваното вещество, като се използват средните стойности от две повторни измервания на DOC с оглед да може да се оцени валидността на изпитването (вж. 1.5.2). За изчислението се използва следното уравнение:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}} \right) \times 100$$

където:

D_t = % разграждане за време I,

C_o = средна начална концентрация на DOC в среда с инокулант, съдържаща изпитваното вещество (mg DOC/l),

C_t = средна концентрация на DOC в среда с инокулант, съдържаща изпитваното вещество към времето t (mg DOC/l),

C_{b0} = средна начална концентрация на DOC в контролна проба с инокулант в минерална среда (mg DOC/l),

C_{bt} = средна концентрация на DOC в контролна проба с култура в минерална среда към времето t (mg DOC/l).

Всички концентрации се измерват експериментално.

I.7.2. Разграждане, измервано чрез специфичен анализ

Когато са достъпни специфични аналитични данни, първоначалното биоразграждане се изчислява по формулата:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

където:

D_t = % на разграждане за времето I, нормално 28 дни,

S_a = остатъчно количество от изпитваното вещество в среда с инокулант към края на изпитването (mg),

S_b = остатъчно количество от изпитваното вещество в контролната проба с вода/среда, към която е прибавено само изпитваното вещество (mg).

▼B**I.7.3. Абиотично разграждане**

Когато се използва стерилна абиотична контрола, за изчисляване на процента на абиотичното разграждане се използва:

$$\% \text{ абиотично разграждане} = \frac{C_{S(0)} - C_{S(t)}}{C_{S(0)}} \times 100$$

където

$C_{S(0)}$ = концентрацията на DOC в стерилната контрола към деня 0;

$C_{S(t)}$ = концентрацията на DOC в стерилната контрола към деня t.

I.8. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

По възможност протоколът от изпитването трябва да съдържа следното:

- изпитвани и сравнителни химични вещества и тяхната чистота;
- условия на изпитването;
- инокулант: естество и място на вземане и всякакво предварително третиране;
- съотношение и естество на индустриалните отпадъци в канализацията, ако са известни;
- продължителност на изпитването и температура;
- начин на обработка в случай на трудно разтворими химични вещества;
- приложен метод за изпитване; следва да бъдат представени научно обосновани причини и обяснения за всяка промяна в процедурата;
- таблица с данни;
- всякакви наблюдавани явления на инхибиране;
- всяко наблюдавано абиотично разграждане;
- специфични данни от химичен анализ, ако са достъпни;
- аналитични данни от междинните продукти, ако са достъпни;
- следва ясно да са обозначени кривата/диаграмата на процента на разграждане във времето за изпитваните и за сравнителните вещества; латентната фаза (лаг-фазата), фазата на разграждане, 10-дневният период от време и наклонът (вж. приложение I). Ако изпитването се съгласува с критериите за валидност, за графиката може да се използва средният процент на разграждане в колбите, съдържащи изпитваното вещество;
- процентът на усвояване след 10-дневен период и при платото или в края на изпитването.

ЧАСТ II. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА DOC ЧРЕЗ СКОРОСТТА НА ОТМИРАНЕ (МЕТОД В.4-А)**II.1. ПРИНЦИП НА МЕТОДА**

Един измерен обем от бактериална култура в минерална среда, съдържаща позната концентрация на изпитваното вещество (10—40 mg DOC/l) като единствен номинален източник на органичен въглерод, се аерира на тъмно или при дифузна светлина при $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

▼B

Разграждането се следи чрез анализ на DOC на чести интервали през един 28-дневен период от време. Степента на биоразграждане се изчислява чрез изразяване на концентрацията на изразходвания DOC (коригирана с тази на контролната проба с инокулант като процент от първоначалната концентрация. Степента на първичното биоразграждане може също да се изчисли от допълнителния химичен анализ, направен в началото и в края на инкубацията.

II.2. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**II.2.1. Апаратура**

- а) Конични колби, напр. от 250 ml до 2 l, в зависимост от необходимия обем за анализ на DOC.
- б) Клатачна машина за разполагане на коничните колби или с автоматично регулиране на температурата, или използвана в пространство с постоянна температура и с достатъчна мощност, за да се поддържат аеробни условия във всички колби.
- в) Апарат за филтруване, с подходящи мембрани.
- г) Анализатор за DOC.
- д) Апарат за определяне на разтворен кислород.
- е) Центрофуга.

II.2.2. Приготвяне на минерална среда

За приготвянето на изходните разтвори вж. I.6.2.

Смесват се 10 ml от разтвор а) с 800 ml вода за разреждане, добавят се по 1 ml от разтвори от б) до г) и се долива до 1 l.

II.2.3. Предварителна подготовка и приготвяне на инокуланта

Инокулантът може да произхожда от различни източници: активна утайка, отток от канализация, повърхностни води, почви или смес от всички тях.

Вижте I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. и I.6.5.

II.2.4. Подготовка на колбите

Като пример: наливат се порции от по 800 ml минерална среда в конични колби от 2 l и се добавят достатъчни обеми от изходните разтвори на изпитваните и сравнителните вещества в отделни колби до достигане на концентрация на вещества еквивалентна на 10—40 mg DOC/l. Проверяват се стойностите на рН и се коригират, ако е необходимо, до 7,4. В колбите се добавя инокулантът от активна утайка или друг източник (вж. I.6.4) до достигане на крайна концентрация не по-голяма от 30 mg суспендирани частици на литър. Приготвят се също така контролни проби с инокулант в минерална среда, но без изпитваното или сравнителното вещество.

Ако е необходимо, използва се един съд, за да се провери възможният ефект на инхибиране на изпитваното вещество чрез посявка на разтвор, съдържащ в минерална среда съпоставими концентрации от изпитваното и сравнителното вещество.

Също така, ако се налага, се зарежда допълнителна стерилна колба, за да се провери дали изпитваното вещество се разгражда абиотично, като се използва разтвор на веществото без инокулант (вж. I.6.6).

▼B

Допълнително, ако се подозира, че изпитваното вещество се адсорбира значително върху стъклото, утайката и т.н., се прави предварителна оценка на степента на адсорбция, а с това и на пригодността на метода за изпитване на веществото (вж. таблица 1). Зарежда се колба, съдържаща изпитваното вещество, инокуланта и стерилизиращ агент.

Във всички колби се долива минерална среда до 1 l и след размесване се взема проба от всяка колба за определяне на началната концентрация на DOC (вж. приложение П.4). Отворите на колбите се покриват например с алуминиево фолио, така че да се позволи свободен обмен на въздух между колбата и околната атмосфера. След това съдовете се поставят в клатачната машина за започване на изпитването.

П.2.5. Брой на колбите при един типичен експеримент

Колби 1 и 2: изпитвана суспензия

Колби 3 и 4: контролна проба с инокулант

Колба 5: проба за контрол на процедурата

За предпочитане, когато е необходимо:

Колба 6: абиотична стерилна контрола

Колба 7: проба за контрол на адсорбцията

Колба 8: контрола за токсичност

Вижте също I.6.7.

П.2.6. Изпълнение на изпитването

По време на цялото изпитване се определя концентрацията на DOC двукратно във всяка колба през известни интервали от време, достатъчно често, за да може да се определят началото на 10-дневния период и процентът на изразходване в края на 10-дневния период. Взема се само минималният обем от изпитваната суспензия, необходим за всяко определяне.

Ако е необходимо, преди вземането на пробите се възстановяват загубите от изпарение в колбите чрез прибавяне на достатъчно количество вода за разреждане (I.6.1). При вземането на проба средата с инокуланта се разклаща добре и се проверява дали материалът, прилепнал по стените на съдовете, е разтворен или суспендиран, преди да се вземе пробата. Веднага след вземането пробата се филтрира през мембранен филтър или центрофугира (приложение П.4). В същия ден се прави анализ на филтрираните или центрофугираните проби, в противен случай те се съхраняват при 2—4 °C за максимум 48 часа или под -18°C за по-дълги периоди.

П.3. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ**П.3.1. Обработка на резултатите**

Пресмята се процентът на разграждане за времето t , както е дадено в I.7.1 (определяне на DOC) или, по избор, в I.7.2 (специфичен анализ).

Всички резултати се записват в предоставените таблици с данни

▼B**II.3.2. Валидност на резултатите**

Вж. I.5.2.

II.3.3. Протокол от изпитването

Вж. I.8.

II.4. ПРОТОКОЛ ЗА ДАННИ

По-долу е даден примерен протокол за данни.

ИЗПИТВАНЕ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА DOC ЧРЕЗ СКОРОСТТА НА ОТМИРАНЕ**1. ЛАБОРАТОРИЯ****2. ДАТА НА ЗАПОЧВАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО****3. ИЗПИТВАНО ВЕЩЕСТВО**

Име:

Концентрация на изходния разтвор: ... mg/l като химично вещество

Начална концентрация в средата: ... mg/l като химично вещество

4. ИНОКУЛАНТ

Източник:

Извършена обработка:

Предварителна подготовка, ако има такава:

Концентрация на суспендирани вещества в реакционната смес: mg/l

5. ОПРЕДЕЛЯНИЯ НА ВЪГЛЕРОД

Анализатор на въглерод:

	Колба номер		DOC след n дни (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Изпитвано вещество плюс инокулант	1	a ₁					
		a ₂					
		a, средно C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		b, средно c _{b(t)}					

▼ B

	Колба номер		DOC след n дни (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Контролна проба с инокулант без изпитваното вещество	3	c ₁					
		c ₂					
		c, средно C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		d, средно C _{d(t)}					
$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$							

6. ОЦЕНЯВАНЕ НА ПЪРВИЧНИ ДАННИ ОПРЕДЕЛЯНИЯ НА ВЪГЛЕРОД

Колба №		% на разграждане след n дни				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Средно (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D₁ и D₂ не следва да се осредняват, ако има значителна разлика помежду им.

Забележка: подобни протоколи могат да се използват за сравнителното вещество и за контролата за токсичност.

7. АБИОТИЧНА КОНТРОЛНА ПРОБА (по избор)

	Време (дни)	
	0	t
Концентрация на DOC (mg/l) в стерилната контрола	C _{s(o)}	C _{s(t)}

$$\% \text{ абиотично разграждане} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. СПЕЦИФИЧЕН ХИМИЧЕН АНАЛИЗ

	Остатъчно количество от изпитваното вещество в края на изпитването (mg/l)	% на първично разграждане
Стерилна контрола	S _b	

▼B

	Остатъчно количество от изпитваното вещество в края на изпитването (mg/l)	% на първично разграждане
Среда за изпитване с инокулант	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ЧАСТ III. МОДИФИЦИРАН СКРИНИНГ НА ОИСП (метод В.4-Б)**III. I. ПРИНЦИП НА МЕТОДА**

В едно измерено количество минерална среда, съдържаща позната концентрация на изпитваното вещество (10—40 mg DOC на литър) като единствен номинален източник на органичен въглерод, се инокулират с 0,5 ml отток на литър среда. Сместа се аерира на тъмно или на дифузна светлина при 22 ± 2°C.

Разграждането се следи чрез анализ на DOC на чести интервали за 28-дневен период. Степента на биоразграждане се изчислява чрез изразяване на концентрацията на изразходвания DOC (коригирана с тази на контролата с инокуланта) като процент от първоначалната концентрация. Степента на първичното биоразграждане може също да се изчисли от допълнителен химичен анализ, направен в началото и в края на инкубацията.

III.2. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**III.2.1. Апаратура**

- а) Конични колби, от 250 ml до 2 l, в зависимост от необходимия обем за анализ на DOC.
- б) Клатачна машина за разполагане на коничните колби или с автоматично регулиране на температурата или използвана в пространство с постоянна температура и с достатъчна мощност, за да се поддържат аеробни условия във всички колби.
- в) Апарат за филтруване с подходящи мембрани.
- г) Анализатор за DOC.
- д) Апарат за определяне на разтворен кислород.
- е) Центрофуга.

III.2.2. Приготвяне на минерална среда

За приготвянето на изходните разтвори вижте 1.6.2.

Смесват се 10 ml от разтвор а) с 80 ml вода, прибавят се по 1 ml от разтвори от б) до г) и се долива до 1 l.

Този метод използва само 0,5 ml отток на литър като инокулант и поради това средата трябва да се подсили с микроелементи и растежни фактори. Това се прави чрез добавяне на 1 ml от всеки от следните разтвори на литър от крайната среда:

▼B

Разтвор на микроелементи:

Манганов сулфат тетрахидрат, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	39,9 mg
Борна киселина, H_3BO_3	57,2 mg
Цинков сулфат хептахидрат, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	42,8 mg
Амониев хептамолибдат, $(NH_4)_6 MO_7 O_{24}$	34,7 mg
Fe-хелат ($FeCl_3$ етилендиаминтетраоцетна киселина)	100 mg

Разтварят се във вода и се доливат с разреждаща вода до 1 литър.

Разтвор на витамини:

Екстракт от дрожди	15,0 mg
--------------------	---------

Разтваря се екстракт от дрожди в 100 ml вода. Стерилизира се чрез филтруване през мембранен филтър 0,2 μm или се приготвя пресен.

III.2.3. Приготвяне и предварителна подготовка на инокулант

Инокулантът се взема от оттока на ГСПОВ или лабораторно звено, приемащо предимно битови отпадъчни води. Вж. I.6.4.2 и I.6.5.

Използва се 0,5 ml на литър минерална среда.

III.2.4. Подготовка на колбите

Като пример: наливат се порции от по 800 ml минерална среда в конични колби от 2 l и се добавят достатъчни обеми от изходните разтвори на изпитваните и сравнителните вещества в отделни колби до достигане на концентрация на химичното вещество, еквивалентна на 10 — 40 mg DOC/l. Проверяват се стойностите на рН и се коригират, ако е необходимо до 7,4. В колбите се добавя инокулант от оттока на ГСПОВ в количество 0,5 ml/l (вж. I.6.4.2). Приготвят се също така контролни проби с инокулант в минерална среда, но без изпитваното или сравнителното вещество.

Ако е необходимо, използва се един съд, за да се провери възможният ефект на инхибиране на изпитваното вещество чрез посявка на разтвор, съдържащ в минерална среда съпоставими концентрации от изпитваното и сравнителното вещество.

Също така, ако се налага, се зарежда допълнителна стерилна колба, за да се провери дали изпитваното вещество се разгражда абиотично, като се използва разтвор на веществото без инокулант (вж. I.6.6).

Допълнително, ако се подозира, че изпитваното вещество се адсорбира значително върху стъкло, утайка и т.н., се прави предварителна оценка на степента на адсорбция, а с това и на пригодността на метода за изпитване на химичното вещество (вж. таблица 1). Зарежда се колба, съдържаща изпитваното вещество, инокуланта и стерилизиращ агент.

Във всички колби се долива минерална среда до 1 l и след размесване се взема проба от всяка колба за определяне на началната концентрация на DOC (вж. приложение II.4). Отворите на колбите се покриват например с алуминиево фолио, така че да се позволи свободен обмен на въздух между колбата и околната атмосфера. След това съдовете се поставят в латачната машина за започване на изпитването.

▼B**III.2.5. Брой на колбите при типичен експеримент**

Колби 1 и 2: изпитвана суспензия

Колби 3 и 4: контролна проба с инокулант

Колба 5: проба за контрол на процедурата

За предпочитане, когато е необходимо:

Колба 6: абиотична стерилна контрола

Колба 7: проба за контрол на адсорбцията

Колба 8: контрола за токсичност

Вж. също I.6.7.

III.2.6. Изпълнение на изпитването

По време на цялото изпитване се определя концентрацията на DOC двукратно във всяка колба през известни интервали от време, достатъчно често, за да може да се определи началото на 10-дневния период и процента на изразходване в края на 10-дневния период. Взема се само минималният обем от изпитваната суспензия, необходим за всяко определяне.

Ако е необходимо, преди вземането на пробите се възстановяват загубите от изпарение в колбите чрез прибавяне на достатъчно количество вода за разреждане (I.6.1). При вземането на проба средата с инокуланта се разклаща добре и се проверява дали материалът, полепнал по стените на съдовете, е разтворен или суспендиран, преди да се вземе пробата. Веднага след вземането пробата се филтрира през мембранен филтър или центрофугира (приложение II.4). В същия ден се прави анализ на филтрираните или центрофугираните проби, в противен случай те се съхраняват при 2—4 °C за максимум 48 часа или под –18°C за по-дълги периоди.

III.3. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ**III.3.1. Обработка на резултатите**

Пресмята се процентът на разграждане за времето t , както е дадено в I.7.1 (определяне на DOC) или, по избор, в I.7.2 (специфичен анализ).

Всички резултати се записват в предоставените таблици с данни

III.3.2. Валидност на резултатите

Вж. I.5.2.

III.3.3. Протокол от изпитването

Вж. I.8.

III.4. ПРОТОКОЛ ЗА ДАННИ

По-долу е даден примерен протокол за данни.

МОДИФИЦИРАНО ИЗПИТВАНЕ НА ОИСП**1. ЛАБОРАТОРИЯ****2. ДАТА НА ЗАПОЧВАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**

▼B

3. ИЗПИТВАНО ВЕЩЕСТВО

Име:

Концентрация на изходния разтвор: ... mg/l като химично вещество

Начална концентрация на средата: ... mg/l като химично вещество

4. ИНОКУЛАНТ

Източник:

Извършена обработка:

Предварителна подготовка, ако има такава:

Концентрация на суспендирани частици в реакционната смес: mg/l

5. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВЪГЛЕРОДА

Анализатор на въглерод

	Колба №		DOC след n дни (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Изпитвано вещество плюс инокулант	1	a ₁					
		a ₂					
		a, средно C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		B, средно C _{b(t)}					
Контролен инокулант без изпитваното вещество	3	c ₁					
		c ₂					
		C, средно C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		d, средно C _{d(t)}					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. ОЦЕНЯВАНЕ НА ПЪРВИЧНИТЕ ДАННИ

Колба №		% на разграждане след n дни				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼ B

Колба №		% на разграждане след n дни				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}} \right) \times 100$	0				
Средна стойност (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D₁ и D₂ не трябва да се осредняват, ако имат значителна разлика.

Забележка: подобни протоколи могат да се използват за сравнителното химично вещество и за контролата за токсичност.

7. АБИОТИЧНА КОНТРОЛА (по избор)

	Време (дни)	
	0	t
Концентрация на DOC (mg/l) в стерилната контрола	C _{s(o)}	C _{s(t)}

$$\% \text{ абиотично разграждане} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. СПЕЦИФИЧЕН ХИМИЧЕН АНАЛИЗ (по избор)

	Остатъчно количество от изпитваното вещество в края на изпитването (mg/l)	% на първично разграждане
Стерилна контрола	S _b	
Среда за изпитване с инокуланта	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ЧАСТ IV. МЕТОД ЗА ОТДЕЛЯНЕ НА CO₂ (МЕТОД В.4-В)

IV.1. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Един измерен обем на инокулант в минерална среда, съдържаща позната концентрация от изпитваното химично вещество (10—20 mg DOC или ТОС/l) като единствен номинален източник на органичен въглерод, се аерира чрез преминаване на контролиран дебит на чист от въглероден диоксид въздух на тъмно или при дифузна светлина. Разграждането се проследява повече от 28 дни чрез определяне на произведения въглероден диоксид, който се улавя в бариев или натриев хидроксид и се измерва чрез титруване на остатъчния хидроксид или като неорганичен въглерод. Количеството въглероден диоксид, произведено от изпитваното вещество (коригирано с това, което произхожда от контролния инокулант) се изразява като процент от ThCO₂. Степента на биоразграждане може също да бъде изчислена чрез допълнителен анализ на DOC, който се прави в началото и в края на инкубацията.

▼B**IV.2. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА****IV.2.1. Апаратура**

- а) Колби, 2—5 l, всяка снабдена с тръба за аериране, достигаща почти до дъното на съда, и отдушник.
- б) Магнитни бъркалки, при оценяване на трудноразтворими химични вещества.
- в) Колби за абсорбция на газа.
- г) Уред за контролиране и измерване на въздушния поток.
- д) Апарат за поглъщане на въглероден диоксид, за подготовка на въздух, несъдържащ въглероден диоксид; съответно може да се използва смес от несъдържащ CO₂ кислород и несъдържащ CO₂ азот от газови колби в правилно съотношение (20 % O₂; 80 % N₂).
- е) Уред за определяне на въглероден диоксид или чрез титруване, или чрез някаква друга форма на анализатор на неорганичен въглерод.
- ж) Уред за мембранно филтруване (по избор).
- з) Анализатор на DOC (по избор)

IV.2.2. Приготвяне на минерална среда

За приготвянето на изходните разтвори вж. I.6.2.

Смесват се 10 ml от разтвор а) с 800 ml разреждаща вода, прибавят се по 1 ml от разтворите от б) до г) и се долива до 1 l.

IV.2.3. Приготвяне и предварителна подготовка на инокуланта

Инокулантът може да произлиза от различни източници: активна утайка, отточни канални води, повърхностни води, почви или смес от всички тях.

Вж. I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 и I.6.5.

IV.2.4. Приготвяне на колбите

Като пример са дадени обемите и теглата, необходими за 5-литрови колби, съдържащи 3 l от суспензията. Ако се използват по-малки обеми, стойностите се променят съответно, но трябва да се осигури точно измерване на образувания въглероден диоксид.

Във всяка 5-литрова колба се прибавят 2 400 ml минерална среда. Прибавя се подходящ обем от приготвената активна утайка (вж. I.6.4.1 и I.6.5), за да се получи концентрация на суспендираните частици не по-висока от 30 mg/l в крайните 3 l смес на инокуланта. Друга възможност е първо да се разреди приготвената утайка до суспензия от 500—1 000 mg/l в минералната среда, преди аликвотна част от нея да се прибави към съдържанието на колба от 5 l с оглед да се получи концентрация от 30 mg/l. Това осигурява по-голяма точност. Могат да се използват и други източници на инокулант (вж. I.6.4.2).

Тези смеси с инокулант се аерират с несъдържащ CO₂ въздух в продължение на 12 часа, за да се изчисти системата от въглероден диоксид.

▼B

Прибавят се поотделно известни обеми от изходните разтвори на изпитваното и сравнителното вещество към две колби до получаване на концентрации на дадените химични вещества от 10 до 20 mg DOC или TOC/l. Оставят се няколко колби без добавка на вещества като контролен инокулант. Трудноразтворимите вещества за изпитване се прибавят директно в колбите на базата на обем или на тегло и с тях се процедира, както е описано в приложение III.

Ако се изисква, една колба се използва за проверка на възможен инхибиторен ефект на изпитваното химично вещество чрез прибавяне на изпитваното и сравнителното вещества при същата концентрация както в другите колби.

Също така, ако се изисква, една стерилна колба се използва за проверка дали изпитваното вещество се разгражда абиотично, използвайки разтвор на веществото без инокулант (вж. I.6.6). Стерилизира се чрез прибавяне на токсично вещество с подходяща концентрация.

Обемите на суспензиите във всички колби се доливат до 3 l чрез прибавяне на минерална среда, предварително аерирана с въздух, свободен от CO₂. По избор могат да се отделят проби за анализ на DOC (вж. приложение II.4) и/или за друг специфичен анализ. Абсорбционните колби се свързват с отдушниците на колбите.

Ако се използва бариев хидроксид, се присъединяват три абсорбционни колби, като всяка съдържа по 100 ml от 0,0125 M [mol/l] разтвор на бариев хидроксид, последователно към всяка 5-литрова колба. Разтворът не трябва да съдържа утаен сулфат и карбонат и неговата концентрация трябва да се определя непосредствено преди употреба. Ако се използва натриев хидроксид, се присъединяват два абсорбционни съда, като вторият действа като контрола на първия, за да се покаже, че цялото количество въглероден диоксид е абсорбирано в първия съд. За абсорбция са подходящи колби, които се затварят с капачки от серумни колби. Прибавят се 200 ml 0,05 M [mol/l] натриев хидроксид към всяка колба, което е достатъчно да абсорбира цялото количество въглероден диоксид, отделен, когато изпитваното вещество се разгради напълно. Натриевият хидроксид, даже пряно приготвен, съдържа следи от карбонати. Това се коригира чрез намаляване със стойността на карбоната, съдържащ се в контролната проба.

IV.2.5. Брой на колбите при типичен експеримент

Колби 1 и 2: изпитвана суспензия

Колби 3 и 4: контролна проба с инокуланта

Колба 5: проба за контрол на процедурата

и за предпочитане, когато е необходимо:

Колба 6: абиотична стерилна контрола

Колба 7: контрола за токсичност

Вж. също I.6.7.

IV.2.6. Изпълнение на изпитването

Изпитването се започва с барботиране на суспензиите с въздух без CO₂ при дебит 30—100 ml/min. Периодично се вземат проби от абсорбента на въглероден диоксид за анализ на съдържанието на CO₂. По време на първите десет дни се препоръчва анализът да се прави всеки втори или трети ден и след това всеки пети ден до 28-ия ден, така че да бъде определен 10-дневният период.

▼B

На 28-ия ден се вземат проби (по избор) за DOC и/или специфичен анализ, измерва се рН на суспензиите и се добавя 1 ml концентрирана солна киселина към всяка колба. Колбите се аерират 12 часа, за да се изчисти въглеродният диоксид от изпитваните суспензии. На 29-ия ден се прави последен анализ за отделения въглероден диоксид.

В дните на измерване на CO₂ се откача абсорберът с бариев хидроксид, който е най-близо до колбата, и разтворът на хидроксид се титрува с 0,05 M [mol/l] HCl, като се използва фенолфталеин като индикатор. Преместват се останалите абсорбери с едно място по-близо до колбата и се поставя нов абсорбер, съдържащ 100 ml пресен 0,0125 M [mol/l] бариев хидроксид най-накрая на редицата. Необходимото титруване се прави, например, когато се вижда значителна утайка в първия абсорбер и преди да има видима във втория, или най-малко веднъж на седмица. При избран абсорбент NaOH се взема малка проба със спринцовка (в зависимост от характеристиките на използвания апарат за анализ на въглерод) от разтвора на натриевия хидроксид от абсорбера най-близо до колбата. Пробата се инжектира в частта за неорганичен въглерод на анализатора на въглерод за директен анализ на отделения въглероден диоксид.

Съдържанието на втория абсорбер се анализира едва в края на изпитването, за да се коригира за някакъв евентуален пренос на въглероден диоксид.

IV.3. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

IV.3.1. Обработка на резултатите

Количеството уловен в абсорбера CO₂ след титруване се дава като:

$$\text{mg CO}_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

където:

V = обема M [mol/l] на HCl, използван за титруване на 100 ml от абсорбера (ml),

C_B = концентрация на разтвора на бариевия хидроксид (mol/l),

C_A = концентрация на разтвора на солна киселина (mol/l).

Ако C_B е 0,0125 mol/l и C_A е 0,05 mol/l, титрирането за 100 ml бариев хидроксид е 50 ml и теглото на CO₂ се дава от:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl титрувани} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

Така в този случай факторът за изчисляване на отделеното количество mg CO₂ по обема на HCl, изразходвана за титруване, е 1,1.

Изчисляват се поотделно теглата на отделения CO₂, произведен само от инокуланта и от инокуланта плюс изпитваното вещество, като се използват съответните стойности от титруването; а разликата е теглото на CO₂, отделен само от разграждането на изпитваното вещество.

Например, ако само при инокуланта е титрувано с 48 ml, а при инокуланта плюс изпитваното вещество — с 45 ml, тогава

$$\text{CO}_2 \text{ от инокуланта} = 1,1 \times (50 - 48) = 2,2 \text{ mg}$$

▼ B

CO_2 от инокуланта плюс изпитваното вещество = $1,1 \times (50 - 45) = 5,5 \text{ mg}$

и така теглото на произведения CO_2 от изпитваното вещество е 3,3 mg.

Процентът на биоразграждане се изчислява от:

$$\% \text{ разграждане} = \frac{\text{те произведен } \text{CO}_2 \times 100}{\text{ThCO}_2 \times \text{mg прибавено изпитвано вещество}}$$

или

$$\% \text{ разграждане} = \frac{\text{mg произведен } \text{CO}_2 \times 100}{\text{mg TO добавено при изпитване то} \times 3,67}$$

където 3,67 е фактор на преобразуване (44/12) на въглерода във въглероден диоксид.

Процентът разграждане се получава след всеки интервал от време чрез прибавяне на процентните стойности за ThCO_2 изчислени за всеки от дните до времето, до което е измервано.

При абсорберите с натриев хидроксид количеството произведен въглероден диоксид се изчислява, изразено като неорганичен въглерод (IC) (mg), чрез умножаване на концентрацията на IC в абсорбента по обема на абсорбента.

Процентът на разграждане се изчислява от:

$$\% \text{ ThCO}_2 = \frac{\text{mg IC встъкленицата} - \text{mg IC в контролата}}{\text{mg TOC прибавен като вещество за изпитване}} \times 100$$

Изчислява се намалението на DOC (по избор), както е описано в I.7. Тези и всички останали резултати се записват във формуляра за данни.

IV.3.2. **Валидност на резултатите**

Съдържанието на неорганичен въглерод (IC) в суспензията с изпитваното вещество в минерална среда в началото на изпитването следва да бъде по-малко от 5 % от общия въглерод (TC) и общото отделяне на CO_2 от контролния инокулант в края на изпитването нормално не следва да надвишава 40 mg/l средно. Ако получените стойности са по-високи от 70 mg CO_2 /литър, резултатите и експерименталната техника следва критично да се проверят.

Вж. също I.5.2.

IV.3.3. **Протокол от изпитването**

Вж. I.8.

IV. 4. ПРОТОКОЛ ЗА ДАННИ

Тук е даден примерен протокол за данни.

ИЗПИТВАНЕ ЗА ОТДЕЛЯНЕ НА ВЪГЛЕРОДЕН ДИОКСИД

1. ЛАБОРАТОРИЯ

2. ДАТА НА ЗАПОЧВАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

3. ИЗПИТВАНО ВЕЩЕСТВО

Име:

Концентрация на изходния разтвор: ... mg/l като химично вещество

▼B

Начална концентрация в средата: ... mg/l като химично вещество

Общ въглерод, добавен към колбата: ... mg C

ThCO₂: mg CO₂

4. ИНОКУЛАНТ

Източник:

Извършена обработка:

Предварителна подготовка, ако има такава:

Концентрация на суспендирани вещества в реакционната смес: mg/l

5. ОТДЕЛЯНЕ НА ВЪГЛЕРОДЕН ДИОКСИД И РАЗГРАЖДАНЕ

Метод: Ba(OH)₂ NaOH или друг

Време (ден)	Образуван CO ₂ от изпитването (mg)		Образуван CO ₂ от контролната проба (mg)		Кумулиран CO ₂ (mg) (изпитв. минус средна от контролата)		ThCO ₂ $\frac{\text{Кумулиран CO}_2}{\text{ThCO}_2} \times 100$		
	1 2	средно	3 4	средно	1	2	1	2	средно
0									
n ₁									
n ₂									
n ₃									
28									

Забележка: подобни форми могат да се използват за сравнителното вещество и за контролата за токсичност.

6. АНАЛИЗ НА ВЪГЛЕРОД (не е задължителен)

Анализатор на въглерод:

Време(ден)	Контрола mg/l	Изпитвано вещество mg/l
0	C _{b(o)}	C _o
28 (*)	C _{b(t)}	C _t

(*) Или в края на инкубацията.

▼B

$$\% \text{ изразходван DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(0)}} \right) \times 100$$

7. АБИОТИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ (по избор)

$$\% \text{ абиотично разграждане} = \frac{\text{образуван CO}_2 \text{ в стерилна стъкленица след 28 дни (mg)}}{\text{ThCO}_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

ЧАСТ V. ИЗПИТВАНЕ ЧРЕЗ МАНОМЕТРИЧНА РЕСПИРОМЕТРИЯ (МЕТОД В.4-Г)**V.1. ПРИНЦИП НА МЕТОДА**

Измерено количество от инокуланта в минерална среда, съдържаща известна концентрация от изпитваното вещество (100 mg/l от изпитваното вещество, така че да даде 50 — 100 mg ThOD/литър) като единствен номинален източник на органичен въглерод, се разбърква в затворена колба при постоянна температура (± 1 °C или още по-точно) за 28 дни. Консумацията на кислород се определя или чрез измерване на количеството кислород (проведен електролитно), необходим да поддържа постоянен газов обем в респирометричната колба, или от изменението на обема или налягането (или комбинация от двете) в апаратурата. Отделеният въглероден диоксид се абсорбира от разтвор на калиев хидроксид или друг подходящ абсорбент. Количеството кислород, погълнат от изпитваното вещество (коригирано с това на контролния инокулант, изпитван успоредно), се изразява като процент от ThOD или ХПК (COD). По избор първичното биоразграждане може да се изчислява чрез допълнителен специфичен анализ, изпълнен в началото и в края на инкубацията, а пълното биоразграждане – чрез анализ на DOC.

V.2. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**V.2.1. Апаратура**

- а) подходящ респирометър;
- б) устройство за регулиране на температурата, поддържащо ± 1 °C, или по-добро;
- в) уред за мембранно филтруване (по избор);
- г) уред за анализ на въглерод (по избор).

V.2.2. Приготвяне на минерална среда

За приготвянето на изходните разтвори вж. I.6.2.

Смесват се 10 ml от разтвор а) с 800 ml вода за разреждане, прибавя се по 1 ml от разтвори от б) до г) и се долива до 1 l.

V.2.3. Приготвяне и предварителна подготовка на инокуланта

Инокулантът може да произхожда от различни източници: активна утайка, отток на канални води, повърхностни води, почви или смес от всички.

Вж. I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 и I.6.5.

V.2.4. Приготвяне на колбите

Приготвят се разтвори от изпитваното и сравнителното вещество, на отделни партии, еквивалентни на минерална среда с концентрация обикновено 100 mg вещество/литър (даваща най-малко 50—100 mg ThOD/l), като се използват изходните разтвори.

▼B

Изчислява се ThOD на базата на образуване на амониеви соли, освен ако не се очаква нитрификация, когато изчисляването следва да се базира върху образуването на нитрат (вж. приложение II.2)

Определят се стойностите на рН и ако е необходимо, се коригират до $7,4 \pm 0,2$.

Трудноразтворими вещества се прибавят на по-късни етапи (вж. по-долу).

Ако следва да се определя токсичността на изпитваното вещество, се приготвя допълнително разтвор в минерална среда, съдържащ изпитваното и сравнителното вещество в същите концентрации както в индивидуалните разтвори.

Ако се изисква измерване на физикохимичното усвояване на кислорода, се приготвя разтвор на изпитваното вещество, обикновено 100 mg ThOD/l, който се стерилизира чрез прибавяне на подходящо токсично вещество (вж. I.6.6).

Необходимите обеми от разтворите на изпитваното и сравнителното вещество се дублират най-малко в по две колби. Към други колби се налива само минерална среда (за контролния инокулант) и, ако се изисква, смесен разтвор от изпитваното и сравнителното вещества и стерилен разтвор.

Ако изпитваното вещество е трудно разтворимо, се прибавя директно на този етап, на базата на обем или на тегло, или се процедира, както е описано в приложение III. Прибавя се калиев хидроксид, гранули натриева вар (смес от натриев хидроксид и калциев оксид) или друг абсорбент в клетките за абсорбция на CO₂.

V.2.5. **Брой на колбите при типичен експеримент**

Колби 1 и 2: изпитвана суспензия

Колби 3 и 4: контролна проба с инокулант

Колба 5: проба за контрол на процедурата

За предпочитане, когато е необходимо:

Колба 6: стерилна контрола

Колба 7: контрола за токсичност

Вж. също I.6.7.

V.2.6. **Изпълнение на изпитването**

Съдовете се оставят да достигнат желаната температура и подходящите съдове се посяват с приготвена активна утайка или друг източник на инокулант, така че да се получи концентрация на суспендирани частици не по-висока от 30 mg/l. Апаратурата се сглобява, включва се разбъркването, проверява се за херметичност по отношение на въздуха и започва измерването на поемането на кислород. Обикновено не са необходими повече грижи освен отчитането на необходимите данни и ежедневни проверки дали се поддържат точната температура и съответното разбъркване.

Усвояването на кислород се изчислява по редовно правени отчитания, на чести интервали, като се използват методите, дадени от производителя на апаратурата. В края на инкубацията, нормално 28 дни, се измерва рН на съдържанието на колбите, по-специално ако поемането на кислород е ниско или по-високо от ThOD_{NH4} (за азот-съдържащи съединения).

▼ B

Ако е необходимо, в началото и в края се вземат проби от респирометричните колби за анализ на DOC или на друго специфично вещество (вж. приложение II.4). При първото вземане на проба следва да е сигурно, че е известен обемът на оставащата в колбата суспензия. Когато кислородът се консумира от N-съдържащо съединение, се определя увеличението на концентрацията на нитрит и нитрат за 28 дни и се изчислява корекцията за кислорода, консумиран чрез нитрификацията (приложение V).

V.3. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

V.3.1. Обработка на резултатите

Усвоеното количество кислород (mg) от изпитваното вещество след дадено време (коригирано с това на контролния инокулант за същото време) се разделя на теглото на използваното за изпитването вещество. Това дава биохимичната потребност от кислород (BOD), изразена като mg кислород/mg изпитвано вещество, което е

$$\text{BOD} = \frac{(\text{те } \text{O}_2 \text{ усвоено от изпитваното вещество} - \text{mg } \text{O}_2 \text{ усвоен от контролната проба})}{(\text{mg изпитвано вещество в колбата})}$$

= mg O₂ за mg изпитвано вещество

Определя се процентът на биологичното разграждане или като:

$$\% \text{ на биоразграждане} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg химично вещество})}{\text{ThOD}(\text{mg O}_2 \text{ на вещество})} \times 100$$

или като

$$\% \text{ COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg химично вещество})}{\text{COD}(\text{mg O}_2 \text{ на химично вещество})} \times 100$$

Следва да се отбележи, че тези два метода не дават непременно същата стойност; препоръчително е да се използва последният метод.

За изпитвани вещества, съдържащи азот, се използва подходяща ThOD (NH₄ или NO₃) според това, което се знае или се очаква да стане при наличие на нитрификация (приложение II.2). Ако има нитрификация, но тя още не е завършила, корекцията за консумиран кислород чрез нитрификацията се изчислява от промените в концентрацията на нитрита и нитрата (приложение V).

Когато по избор се правят определяния на органичен въглерод и/или на специфично вещество, процентът на разграждане се изчислява, както е описано в I.7.

Всички резултати се записват в приложения протокол за данни.

V.3.2. Валидност на резултатите

Кислородът, усвоен от контролния инокулант, е нормално 20—30 mg O₂/литър и не следва да е по-висок от 60 mg/l за 28 дни. Стойности, по-високи от 60 mg/l, изискват критична проверка на данните и експерименталните техники. Ако стойностите на рН са извън областта 6—8,5 и кислородната консумация от изпитваното вещество е по-малка от 60 %, изпитването следва да се повтори с по-ниска концентрация на изпитваното вещество.

Вж. също I.5.2.

▼ **B**

		Време (ден)										
		0		7		14		21		28		
% на разграждане	D ₁ (a ₁)											
	D ₂ (a ₂)											
$\frac{\text{БПК}}{\text{ThOD}} \times 100$	Средно (*)											

V=обем на средата в колбата за изпитване

(*) D₁ и D₂ не се осредняват, ако имат значителна разлика.

Забележка: Подобни протоколи може да се използват за сравнителното вещество и за контролата за токсичност.

6. КОРЕКЦИЯ ЗА НИТРИФИКАЦИЯ (вж. приложение V)

Ден	0	28	Разлика
i) Концентрация на нитрат (mg N [азот]/l)			(N)
ii) Кислороден еквивалент(4,57 × N [азот] × V) (mg)	—	—	
iii) Концентрация на нитрит (mg N [азот]/l)			(N)
iv) Кислороден еквивалент(3,43 × N [азот] × V) (mg)	—	—	
ii) + iv) Общ кислороден еквивалент	—	—	

7. АНАЛИЗ НА ВЪГЛЕРОД (по избор)

Анализатор на въглерод:

Време (ден)	Контрола mg/l	Изпитвано вещество mg/l
0	(C _{blo})	(C _o)
28 (*)	(C _{blt})	(C _t)

(*) или в края на инкубацията

$$\% \text{ употребен DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}} \right) \times 100$$

8. СПЕЦИФИЧНО ВЕЩЕСТВО (по избор)

S_b = концентрация на физикохимичната (стерилна) контрола на 28-ия ден

S_a = концентрация в колбата с инокулата на 28-ия ден

$$\% \text{ биоразграждане} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. АБИОТИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ (по избор)

a = консумация на кислород в стерилната колба след 28 дни, mg

$$\text{консумация на O}_2 \text{ за mg изпитваното вещество} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(вж. точки 1 и 3)

$$\% \text{ абиотично разграждане} = \frac{a \times 100}{C_0 V \times \text{ThOD}}$$

ЧАСТ VI. ИЗПИТВАНЕ ПО МЕТОДА НА ИЗОЛИРАНИТЕ ПРОБИ (МЕТОД В.4-Д)

VI.1. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Разтвор на изпитваното вещество в минерална среда, обикновено 2—5 mg/l, се инокулира със сравнително малък брой микроорганизми от смесена популация и се държи в пълни догоре, затворени колби на тъмно при постоянна температура. Разграждането се следи чрез анализ на разтворения кислород през 28-дневен период. Количеството на усвояния от изпитваното вещество кислород се коригира с това на успоредно заложения контролен инокулант и се изразява като процент от ThOD или COD.

VI.2. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

VI.2.1. Апаратура

- а) Колби за BOD със стъклени запушалки, 250—300 ml.
- б) Водна баня или инкубатор, за съхранение на колбите при постоянна температура (± 1 °C или по-добър), без светлина.
- в) Големи стъклени колби (2—5 литра) за приготвяне на среда и пълнене на колбите за BOD.
- г) Кислороден електрод или оксиметър, или уреди и реагенти за титруване по Winkler.

VI.2.2. Приготвяне на минерална среда

За приготвянето на изходните разтвори вж. I.6.2.

Смесват се по 1 ml от разтвори от а) до г) и се долива с вода за разреждане до 1 литър.

VI.2.3. Приготвяне на инокулант

Инокулант обикновено се взема от оттока на пречиствателна станция или лабораторно звено, приемащи предимно битови отпадъчни води. Алтернативен източник на инокулант са повърхностните води. Нормално се използва от една капка (0,05 ml) до 5 ml от филтрат за 1 литър среда. Може да са необходими допълнителни опити, за да се открие оптималният обем за даден отток (вж. I.6.4.2 и I.6.5).

VI.2.4. Приготвяне на колбите

Минералната среда се аерира силно в продължение на най-малко 20 min. Всяка серия се провежда с минерална среда от една партида. Обикновено средата е готова за използване след престой от 20 часа при температурата на изпитването. Определя се концентрацията на разтворения кислород с контролна цел, като стойността би следвало да бъде около 9 mg/l при 20 °C. Всички операции на прехвърляне и пълнене с наситената с въздух среда се извършват без отделяне на мехурчета, например като се използват сифони.

▼B

Приготвят се успоредни групи от колби за BOD за определяне на изпитваното и сравнителното вещество в едновременни експериментални серии. Събират се достатъчен брой колби за BOD, включително контролен инокулант, за да е възможно измерването на потреблението на кислород да се прави най-малко в две повторения на определени интервали от време, например след 0, 7, 14, 21 и 28 дни. Може да са необходими и повече колби, за да се идентифицира надеждно 10-дневният период.

Прибавя се напълно аерирана минерална среда към големи колби, така че да се напълнят до една трета. Тогава се добавя достатъчно количество от изходните разтвори на изпитваното вещество и на сравнителното вещество към отделни големи колби, така че крайната концентрация на веществата да не е по-висока от 10 mg/l. В друга голяма колба, която е контрола на минералната среда, не се прибавят вещества.

За да не се ограничава активността на инокуланта, концентрацията на разтворения кислород не следва да спада под 0,5 mg/l в колбите за BOD. Това ограничава концентрацията на изпитваното вещество до около 2 mg/l. За трудноразграждащи се вещества и за такива с ниска ThOD, обаче, могат да използват 5—10 mg/l. В някои случаи е препоръчително да се пуснат успоредни серии от изпитваното вещества в две различни концентрации, например 2 и 5 mg/l. Нормално BOD се изчислява на базата на образуване на амониеви соли, но ако се очаква или се знае, че има нитрификация, изчислява се на базата на образуване на нитрат (ThOD_{NO₃}, вж. приложение II.2). Ако, обаче, има нитрификация, но тя не е завършила, промените в концентрацията на нитрита или нитрата се коригират след определяне чрез анализ (вж. приложение V).

Ако ще се изследва токсичността на веществото (в случай, например, че при предишно изпитване е намерена ниска стойност на биоразградимост), е необходима друга серия от колби.

Приготвя се друга голяма колба с аерирана минерална среда (до около една трета от обема) плюс изпитваното вещество и сравнителното вещество с крайни концентрации, които обикновено са същите както в другите големи колби.

Към разтворите в големите колби се прибавя инокулант от оттока (една капка или около 0,05 ml до 5 ml/l) или от друг източник, като например речна вода (вж. I.6.4.2). Накрая разтворите се довеждат до обема с аерирана минерална среда, като се използва маркуч, който достига до дъното на колбата, за да се осигури подходящо смесване.

VI.2.5. Брой на колбите при един типичен експеримент

В типичен експеримент се използват следните колби:

- най-малко 10, съдържащи изпитвано вещество и инокулант (суспензии за изпитване),
- най-малко 10, съдържащи само инокулант (контролен инокулант),
- най-малко 10, съдържащи сравнително вещество и инокулант (проба за контрол на процедурата),

▼B

— и, когато е необходимо, 6 колби, съдържащи изпитвано вещество, сравнително вещество и инокулант (контрола за токсичност). За да се идентифицира със сигурност 10-дневният период, са необходими около два пъти повече колби.

VI.2.6. Изпълнение на изпитването

Всеки приготвен разтвор се разпределя веднага в съответната група от колби за BOD с маркуч, започвайки от долната четвърт (не от дъното) на съответната голяма колба, до напълването на всички колби за BOD. Потупва се леко, за да се освободят всички въздушни мехурчета. Анализира се разтвореният кислород в колбите в нулевия момент по Winkler или с електрод. Съдържанието на колбите може да се консервира за по-късен анализ по метода на Winkler чрез прибавяне на манганов (II) сулфат и натриев хидроксид (първи реагент по Winkler). Внимателно запушените колби, съдържащи кислород, фиксиран като кафяв манганов (III) хидратиран оксид, се съхраняват на тъмно при 10—20 °C за не повече от 24 часа, преди да се продължат следващите етапи на метода на Winkler. Затварят се останалите повторения на колбите, като се внимава да не се включат въздушни мехурчета, и се инкубират при 20 °C на тъмно. Всяка серия трябва да се придружава от пълна успоредна серия за определяне на контролния инокулант. Отделят се най-малко по две колби от всяка серия за анализ на разтворения кислород на определени интервали от време (най-малко веднъж на седмица) по време на 28-дневната инкубация.

Ежеседмичното вземане на проби позволява оценка на процента на усвояване при 14-дневен период, докато вземането на проби на всеки 3—4 дни позволява да се идентифицира 10-дневният период, което ще изисква още двойно повече колби.

За азот-съдържащи изпитвани вещества трябва да се направят корекции за усвояването на кислород чрез нитрификацията. За да се направи това, се определя разтвореният кислород по метода с кислороден електрод и след това се вземат проби от колба за БПК за анализ за нитрит и нитрат. От увеличението на концентрацията на нитрита и нитрата се изчислява използваният кислород (вж. приложение V).

VI.3. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

VI.3.1. Обработка на резултатите

Първо се изчислява BOD след всеки период от време чрез изваждане на намалението на кислорода (mg O₂/литър) при контролния инокулант от това, показано от изпитваното вещество. Разделя се коригираната стойност с концентрацията (mg/l) на изпитваното вещество, за да се получи специфичната БПК като mg кислород на mg изпитвано вещество. Изчислява се процентът на биоразградимост, като се разделя специфичната BOD със специфичната ThOD (изчислена според приложение II.2) или COD (определена чрез анализ, вж. приложение II.3), така:

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg O}_2 \text{ поет от изпитваното вещество} - \text{mg O}_2 \text{ поет от празната проба}}{(\text{mg изпитвано вещество в колбата})}$$

▼B

= mg O₂ изп. вещество

или

$$\% \text{ разграждане} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg изпитвано вещество)}}{\text{ThOD (mg O}_2\text{/mg изпитвано вещество)}} \times 100$$

$$\% \text{ разграждане} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg изпитвано вещество)}}{\text{COD (mg O}_2\text{/mg изпитвано вещество)}} \times 100$$

Трябва да се отбележи, че тези два метода не дават непременно еднаква стойност; препоръчва се използването на последния.

За изпитвани вещества, които съдържат азот, се използва подходяща ThOD (NH₄ или NO₃) според това, което се знае или се очаква да стане при наличие на нитрификация (приложение П.2). Ако има нитрификацията, но тя още не е завършила, корекцията за консумиран кислород чрез нитрификацията се изчислява от промените в концентрацията на нитрит и нитрат (приложение V).

VI.3.2. **Валидност на резултатите**

Намалението на кислорода в контролния инокулант трябва да надвишава 1,5 mg/l разтворен кислород след 28 дни. Стойности, по-високи от тази, изискват проверка на експерименталните техники. Остатъчната концентрация на кислород в изпитвателните колби не трябва да спада под 0,5 mg/l през цялото време. Такива ниски кислородни нива са валидни само ако методът за определяне на разтворения кислород позволява точното измерване на такива равнища.

Вж. също I.5.2.

VI.3.3. **Протокол от изпитването**

Вж. I.8.

VI. 4. **ПРОТОКОЛ ЗА ДАННИ**

Тук е даден примерен протокол за данни.

ИЗПИТВАНЕ ПО МЕТОДА НА ИЗОЛИРАНИТЕ ПРОБИ

1. **ЛАБОРАТОРИЯ**

2. **ДАТА НА ЗАПОЧВАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**

3. **ИЗПИТВАНО ВЕЩЕСТВО**

Име:

Концентрация на изходния разтвор: ... mg/l

Начална концентрация в колбата: ... mg/l

ThOD или COD: ... mg O₂/mg изпитвано вещество

4. **ИНОКУЛАНТ**

Източник:

Извършена обработка:

▼В

Предварителна подготовка, ако има такава:

Концентрация в реакционната смес: ... mg/l

5. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА РАЗТВОРЕНИЯ КИСЛОРОД

Метод: по Winkler/c електрод

Анализи на съдържанието в колбите

Време на инкубация (дни)			Разтворен кислород (mg/l)			
			0	n ₁	n ₂	
Инокулант вещество	без	1	C ₁			
		2	C ₂			
Средно		$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$				
Изпитвано вещество		1	a ₁			
		2	a ₂			
Средно		$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

Забележка: Подобни формуляри могат да се използват за сравнителното съединение и за контролата за токсичност.

6. КОРЕКЦИЯ ЗА НИТРИФИКАЦИЯ (вж. приложение V)

Време на инкубация (дни)		0	n ₁	n ₂	n ₃
i)	Концентрация на нитрат (mg N [азот]/l)				
ii)	Промяна в концентрацията на нитрат (mg N [азот]/l)	—			
iii)	Кислороден еквивалент (mg/l)	—			
iv)	Концентрация на нитрит (mg N [азот]/l)				
v)	Промяна в концентрацията на нитрит (mg N [азот]/l)	—			
vi)	Кислороден еквивалент (mg/l)	—			
(iii) + vi) Общ кислороден еквивалент (mg/l)		—			

7. НАМАЛЯВАНЕ НА РАЗТВОРЕНИЯ КИСЛОРОД: % НА РАЗГРАЖДАНЕ

	Намаляване след n дни (mg/l)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
КОЛБА 1: (m ₁₀ - m _{1x}) - (m _{b0} - m _{bх})				
КОЛБА 2: (m ₂₀ - m _{2x}) - (m _{b0} - m _{bх})				

▼B

	Намаляване след n дни (mg/l)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
КОЛБА 1: $\% D_1 = \frac{[(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \times 100}{\text{Конц. на изп.} \times \text{ThOD химикал}}$				
КОЛБА 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \times 100}{\text{Конц. на изп.} \times \text{ThOD химикал}}$				
$\% \text{ Дсредно (*)} = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Не се изчислява средна стойност, ако има значителна разлика между повторенията.

m_{t0} = стойност в колбата към време 0

m_{tx} = стойност в колбата към време x

m_{b0} = средна стойност в контролата към време 0

m_{bx} = средна стойност в контролата към време x

Прилага се също корекция за нитрификация от iii + vi в точка 6.

8. НАМАЛЯВАНЕ НА РАЗТВОРЕНИЯ КИСЛОРОД В КОНТРОЛНИЯ ИНОКУЛАНТ

Потреблението на кислород от контролния инокулант е: $(m_{b0} - m_{b28})$ mg/l. Това потребление е важно за валидността на изпитването. То трябва да бъде по-малко от 1,5 mg/l.

ЧАСТ VII. ИЗПИТВАНЕ ПО М.І.Т.І (МЕТОД В.4-Е)

VII.1. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Усвояването на кислород от разтвори при разбъркване или от суспензии на изпитваното вещество в минерална среда, с инокуланта от специално отгледани, неадаптирани микроорганизми, се измерва автоматично за период от 28 дни в затъмен, затворен респирометър при 25 ± 1 °C. Отделеният въглероден диоксид се абсорбира в натриева вар. Биоразградимостта се изразява като процент на усвояения кислород (коригиран с усвояването от контролния инокулант) от теоретичната потребност (ThOD). Процентът на първичната биоразградимост може да се изчисли също от допълнителен специфичен химичен анализ, правен в началото и в края на инкубацията или, по избор, чрез анализ на разтворения органичен въглерод (DOC).

VII.2. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

VII.2.1. Апаратура

а) Автоматичен електролитен BOD-метър или респирометър, нормално съоръжен с 6 колби, по 300 ml всяка, и с чаши, съдържащи абсорбент на CO₂.

▼B

- б) Пространство с постоянна температура и/или водна баня при 25 ± 1 °C или по-добра.
- в) Устройство за мембранно филтруване (по избор).
- г) Анализатор на въглерод (по избор).

VII.2.2. Приготвяне на минерална среда

Приготвят се следните изходни разтвори, като се използват реагенти и вода със степен „чист за анализи“ (I.6.1.):

- | | | |
|----|--|---------|
| а) | Монокалиев дихидрогенортофосфат, KH_2PO_4 | 8,50 g |
| | Дикалиев монохидрогенортофосфат, K_2HPO_4 | 21,75 g |
| | Динатриев монохидрогенортофосфат додека-хидрат, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 44,60 g |
| | Амониев хлорид, NH_4Cl | 1,70 g |
| | Разтварят се във вода и се доливат до 1 литър | |
| | Стойността на рН на разтвора трябва да е 7,2 | |
| б) | Магнезиев сулфат хептахидрат, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 22,50 g |
| | Разтваря се във вода и се долива до 1 литър | |
| в) | Калциев хлорид безводен, CaCl_2 | 27,50 g |
| | Разтваря се във вода и се долива до 1 литър | |
| г) | Железен (III) хлорид хексахидрат, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,25 g |
| | Разтваря се във вода и се долива до 1 литър | |

Вземат се по 3 ml от всеки разтвор а), б), в) и г) и се долива вода до 1 литър.

VII.2.3. Приготвяне на инокулант

Събират се свежи проби от не по-малко от десет места, главно от области, където се използват и изхвърлят различни химични вещества. От места като пречиствателни станции на канали и промишлени отпадъчни води, от реки, езера, морета, събират се еднолитрови проби от утайка, повърхностна почва, вода и т.н. и се смесват добре. След премахване на плуващите материали и успокояване се регулира рН на супернатантата до стойност 7 ± 1 с натриев хидроксид или фосфорна киселина.

Използва се подходящ обем от филтрираната супернатанта, за да се напълни утайтелен съд за промиване на активната утайка, и течността се аерира в продължение на 23 1/2 часа. Тридесет минути след спиране на аерацията се отлива около една трета от целия обем на супернатантата, като към утаения материал се добавя равен обем от разтвор (рН 7), съдържащ по 0,1 % от глюкоза, пептон и монокалиев ортофосфат, и се възобновява аерацията. Тази процедура се повтаря по веднъж на ден. Утайкелат трябва да работи по правилата на добрата практика: оттокът трябва да е бистър, температурата трябва да се поддържа 25 ± 2 °C, рН трябва да е 7 ± 1 , утайката трябва да е добре утаена, трябва да има добра аерация, която да поддържа сместа аеробна през цялото време, трябва да присъстват първаци и активността на утайката трябва да се изпитва спрямо сравнително вещество най-малко на всеки три месеца. Утайката не се използва като инокулант, ако станцията не е работила поне един месец, но след не повече от четири месеца. След това се вземат проби от най-малко 10 места през нееднакви интервали от време, веднъж на всеки три месеца.

▼B

За да се поддържат свежата и старата утайки с еднаква активност, филтруваната супернатанта от използваната активна утайка се смесва с равен обем филтрувана супернатанта от прясно събрана смес от десет източника и комбинираната течност се култивира, както е описано по-горе. Утайка за инокуланта се взема 18—24 часа след като апаратурата е била запазена.

VII.2.4. Приготвяне на колбите

Приготвят се следните шест колби:

№ 1: изпитваното вещество във вода за разреждане с концентрация 100 mg/l

№ 2, 3 и 4: изпитваното вещество в минерална среда с концентрация 100 mg/l

№ 5: сравнително вещество (напр. анилин) в минерална среда с концентрация 100 mg/l

№ 6: само минерална среда

Трудноразтворимите изпитвани вещества се добавят директно, на базата на обем или тегло, или се постъпва, както е описано в приложение III, с изключение на това, че не могат да се използват нито разтворители, нито емулгатори. Абсорбентите на CO₂ се прибавят към всички колби в специалните чашки. Регулира се рН до 7,0 в колби с номера 2, 3 и 4.

VII.2.5. Изпълнение на изпитването

Поставя се малък обем инокулант в колби с номера 2, 3 и 4 (изпитвани суспензии), номер 5 (контрола на активността) и номер 6 (контролен инокулант), така че да се получи концентрация на суспендираните частици 30 mg/l. Инокулантът не се прибавя към колба номер 1, която служи като абиотична контрола. Апаратурата се сглобява, проверява се за пропуски на въздух и се включват бъркалките. Започва измерване на усвояването на кислород на тъмно. Всеки ден се проверяват температурата, разбъркването и кулометричният записващ уред за потреблението на кислород, като се отбелязва всяка промяна в цвета на съдържимото в колбите. Потреблението на кислород се отчита директно от шест колби по съответен метод, например с шестканален записващ уред, който дава кривата на BOD. В края на инкубацията, обикновено 28 дни, се измерва рН на съдържимото в колбите и се определя концентрацията на остатъчното изпитвано вещество и разградните му продукти и, в случай на разтворими във вода вещества, концентрацията на DOC (приложение II.4). Обръща се специално внимание на летливите вещества. Ако се очаква нитрификация, се определят концентрациите на нитрат и нитрит, ако е възможно.

VII.3. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ**VII.3.1. Обработка на резултатите**

Разделя се потреблението на кислород (mg) от изпитваното вещество след дадено време, коригирано с това на контролния инокулант за същото време, на теглото на използваното за изпитването вещество. Това дава BOD, изразена като mg кислород/mg изпитвано вещество, което е:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg O}_2 \text{ употребен от изпитваното вещество} - \text{mg O}_2 \text{ употребен от контролата})}{(\text{mg изпитвано вещество в колбата})}$$

$$= \text{mg O}_2 / \text{mg изпитвано вещество}$$

▼ B

Тогава процентът на биоразграждането се получава от:

$$\% \text{ биоразграждане} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg вещество)}}{\text{ThOD (mg O}_2\text{/mg вещество)}} \times 100$$

За смеси ThOD се изчислява от елементния анализ, както за просто съединение. Използва се подходяща ThOD (ThOD_{NH4} или ThOD_{NO3}) според това, дали нитрификацията липсва или е пълна (приложение II.2). Ако обаче има нитрификация, но тя не е напълно завършена, тогава корекцията за усвоения кислород се изчислява от промените в концентрациите на нитрит и нитрат (приложение V).

Процентът на първоначалното биоразграждане се изчислява от загубата на специфично (родителско) химично вещество (вж. 1.7.2.)

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Ако е имало загуба на изпитваното вещество в колба номер 1, измерваща физикохимичното потребление, това се отразява в протокола и се използва концентрацията на изпитваното вещество (S_b) след 28 дни в тази колба, за да се изчисли процентът на биоразграждането.

Когато е направено определяне на DOC (незадължително), се изчислява процентът на пълното биоразграждане от:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100$$

както е описано в I.7.1. Ако е имало загуба на DOC в колба номер 1, измерваща физикохимичното изразходване, концентрацията на DOC в тази колба се използва, за да се изчисли процентът на биоразграждането.

Всички резултати се записват в приложените формуляри за данни.

VII.3.2. **Валидност на резултатите**

Потреблението на кислород в контролния инокулант е нормално 20—30 mg O₂/l и не трябва да е по-високо от 60 mg/l за 28 дни. Стойности, по-високи от 60 mg/l, изискват критична проверка на данните и експерименталните техники. Ако стойността на pH е извън областта 6—8,5 и потреблението на кислород от изпитваното вещество е по-малко от 60 %, изпитването трябва да се повтори с по-ниска концентрация на изпитваното вещество.

Вж. също I.5.2.

Ако процентът на разграждане на анилин, изчислен от консумацията на кислород, не надвишава 40 % след 7 дни и 65 % след 14 дни, изпитването се счита за невалидно.

VII.3.3. **Протокол от изпитването**

Вж. I.8.

VII.4. **ПРОТОКОЛ ЗА ДАННИ**

По-долу е даден примерен протокол за данни.

ИЗПИТВАНЕ ПО МІТІ (I)

1. **ЛАБОРАТОРИЯ**

2. **ДАТА НА ЗАПОЧВАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**



3. ИЗПИТВАНО ВЕЩЕСТВО

Име:

Концентрация на изходния разтвор: ... mg/l като химично вещество

Начална концентрация в средата, C_0 : ... mg/l като химично вещество

Обем на реакционната смес, V : ml

ThOD: ... mg O_2 /l

4. ИНОКУЛАНТ

Места на вземане на проби от утайка:

- | | |
|--------|---------|
| 1) ... | 6) ... |
| 2) ... | 7) ... |
| 3) ... | 8) ... |
| 4) ... | 9) ... |
| 5) ... | 10) ... |

Концентрация на суспендираните частици в активната утайка след аклиматизация със синтетична отпадъчна вода = mg/l

Обем на активната утайка за литър от крайната среда = ...ml

Концентрация на утайката в крайната среда = ...mg/l

5. ПОТРЕБЛЕНИЕ НА КИСЛОРОД: БИОРАЗГРАЖДАНЕ

Вид на използвания респирометър:

		Време (дни)				
		0	7	14	21	28
O ₂ потребление, (mg) от изпитваното вещество	a ₁					
	a ₂					
	a ₃					
O ₂ потребление, (mg) от контролата	b					
Коригирано потребление на O ₂ (mg)	(a ₁ - b)					
	(a ₂ - b)					
	(a ₃ - b)					
БПК на mg изпитвано вещество	$\frac{(a - b)}{C_0 V}$	Колба 1				
		Колба 2				
		Колба 3				
% на разграждане $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1				
		2				
		3				
		Средно (*)				

(*) Не се изчислява средна стойност, ако има значителна разлика между повторенията.

▼B

Забележка: Подобни протоколи могат да се използват за сравнителното съединение.

6. АНАЛИЗ НА ВЪГЛЕРОД (по избор)

Анализатор на въглерод:

Колба	DOC				% DOC изразходван	Средно
	измерен		коригиран			
Вода + изпитвано вещество	a				—	—
Утайка + изпитвано вещество	b ₁		b ₁ -c			
Утайка + изпитвано вещество	b ₂		b ₂ - c			
Утайка + изпитвано вещество	b ₃		b ₃ - c			
Контрола	c		—		—	—

$$\% \text{ разграден} = \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. ДАННИ ОТ СПЕЦИФИЧЕН ХИМИЧЕН АНАЛИЗ

	Остагъчно количество от изпитвано вещество в края на изпитването	% на разграждане
Контролна проба с вода	S _b	
Среда с инокулант	S _{a1}	
	S _{a2}	
	S _{a3}	

$$\% \text{ разграждане} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Изчислява се процент разграждане съответно за колби a₁ и a₃.

8. ЗАБЕЛЕЖКИ

Следва да се приложи крива за BOD във времето, ако има такава.

*Приложение I***СЪКРАЩЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

- DO: Разтворен кислород (mg/l) е концентрацията на разтворения кислород в една водна проба.
- BOD: Биохимична потребност от кислород (g) е количеството кислород, консумирано от микроорганизмите при метаболизиране на едно изпитвано съединение, изразявано също така като g усвоен кислород за g от изпитваното съединение (Виж метод C.5)
- COD: Химична потребност от кислород (g) е количеството кислород, използвано при на окисляването на едно изпитвано съединение с горещ, кисел бихромат; представлява мярка за количеството на наличната окислима материя. Изразява се също така като g кислород, усвоен за g от изпитваното съединение (Виж метод C.6).
- DOC: Разтворен органичен въглерод е органичният въглерод, присъстващ в разтвора или който преминава през филтър 0,45 μm , или остава в супернатанта след центрофугиране при 40 000 m.s^{-2} (\pm 4 000 g) за 15 min.
- ThOD: Теоретична потребност от кислород (mg) е общото количество кислород, необходимо за пълното окисляване на едно химично вещество. То се изчислява от молекулната формула (вж. приложение II. 2) и се изразява също като mg кислород, необходим за mg от изпитваното съединение.
- ThCO₂: Теоретичен въглероден диоксид (mg) е изчисленото количество въглероден диоксид, което ще се получи от известно или измерено съдържание на въглерод в изпитваното съединение, когато то бъде напълно минерализирано. Изразява се също като mg въглероден диоксид, отделен от mg от изпитваното съединение.
- TOC: Общ органичен въглерод в пробата е сумата от органичния въглерод в разтвора и в суспензията.
- IC: Неорганичен въглерод
- TC: Общ въглерод е сумата от органичния и неорганичния въглерод в една проба.

Първично биологично разграждане:

е изменение на химичната структура на едно вещество, причинено от биологично действие, и имащо за резултат загуба на специфично свойство на това вещество.

Пълно биологично разграждане (аеробно):

е равнището на постигнато разграждане, когато изпитваното съединение е напълно усвоено от микроорганизмите и в резултат на това са произведени въглероден диоксид, вода, минерални соли и нови микробни клетъчни съставки (биомаса).

Лесно биоразградими:

Условна класификация на химичните вещества, които са преминали през определени изпитвания за пълна биоразградимост. Тези изпитвания са толкова неоспорими, че се счита, че такива съединения бързо и напълно се разграждат биологично във водна среда при аеробни условия.

▼B*Присъщо биоразградими:*

Класификация на химични вещества, за които има неоспорими доказателства за биологично разграждане (първично или пълно) от което и да е признато изпитване за биоразградимост.

Склонност към третиране:

Способността на съединенията да бъдат отстранявани при биологичната преработка на отпадъчни води, без да повлияват вредно нормалното протичане на процесите на третиране. Най-общо бързо разградимите съединения подлежат на третиране, но това не важи за всички присъщо биоразградими съединения. Абиотични процеси могат също да действат.

Латентно време (лаг-фаза):

Времето от посяването на инокуланта (при изследване чрез скоростта на отмиране), докато процентът на разграждане се увеличи най-малко до 10. Латентното време често е много променливо и слабо възпроизводимо.

Време на разграждане:

Времето от края на латентното време до времето, при което са достигнати 90 % от максималното равнище на разграждане.

10-дневен период:

10-те дни, които непосредствено следват достигане на 10 % разграждане.



Приложение II

ИЗЧИСЛЯВАНЕ И ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПОДХОДЯЩИ ОБОБЩЕНИ ПАРАМЕТРИ

В зависимост от избрания метод ще се изискват определени обобщени параметри. Следващата част описва получаването на тези стойности. Използването на тези параметри е описано при отделните методи.

1. Съдържание на въглерод

Съдържанието на въглерод се изчислява, когато елементният състав е известен, или от данните от елементния анализ на изпитваното вещество.

2. Теоретична потребност от кислород (ThOD)

Теоретичната потребност от кислород (ThOD) може да бъде изчислена, ако елементният състав е известен или е определен чрез елементен анализ. Така за съединението:



без нитрификация,

$$ThOD_{NH_4} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

или с нитрификация

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

3. Химична потребност от кислород (COD)

Химичната потребност от кислород (COD) се определя според метод В.6.

4. Разтворен органичен въглерод (DOC)

Разтвореният органичен въглерод (DOC) е по определение разтвореният органичен въглерод на всяко химично вещество или смес във вода, преминаващи през филтър 0,45 µm.

Пробите се вземат от съдовете за изпитване и веднага се филтрират с апаратура за филтриране, използвайки подходящ мембранен филтър. Първите 20 ml (количеството може да се намали, когато се използват малки филтри) от филтрата се изхвърлят. Обемите от по 10—20 ml или по-малки, ако ще се инжектират (обемът зависи от количеството, необходимо за анализатора на въглерод), се оставят за анализ на въглерод. Концентрацията на DOC се определя с апарат за анализ на органичен въглерод, който е способен да измерва точно концентрации на въглерод, равни или по-ниски от 10 % от началната концентрация на DOC, използвана при изпитването.

Филтрираните проби, които не могат да бъдат анализирани същия работен ден, се оставят в хладилник при 2—4 °C за 48 часа или под — 18°C за по-дълги периоди.

Забележки:

Мембранните филтри често са импрегнирани с повърхностноактивни вещества, които им осигуряват хидрофилност. В такъв случай филтърът може да съдържа до няколко mg разтворим органичен въглерод, който да пречи на определянето на биологичната разградимост. Повърхностноактивни вещества и други разтворими органични съединения се премахват от филтрите чрез варене в дейонизирана вода 3 пъти по 1 час. Филтрите след това се съхраняват във вода за 1 седмица. Ако се използват филтърни патрони за еднократна употреба, всяка партида следва да се проверява дали отделя разтворим органичен въглерод.

▼B

В зависимост от типа на мембрания филтър изпитваното вещество може да се задържи чрез адсорбция. Тогава следва да се получи сигурност, че изпитваното вещество не се задържа върху филтъра.

Вместо филтриране, за отделяне на TOC от DOC може да се използва центрофугиране при $40\,000\text{ m. s}^{-2}$ (4 000 g) за 15 min. Методът не е надежден при начални концентрации $< 10\text{ mg DOC/l}$, ако или не са премахнати всички бактерии, или въглеродът като част от бактериалната плазма се е разтворил повторно.

ПРЕПРАТКИ

- (1) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P. 65;
- (2) Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139;
- (3) DIN-Entwurf 38409 Teil 41 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser-und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschus (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e. V.;
- (4) Gerike, P., The biodegradability testing of poorly watersoluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13(1), 169;

*Приложение III***ОЦЕНКА НА БИОЛОГИЧНАТА РАЗГРАДИМОСТ НА ТРУДНОРАЗТВОРИМИ ВЕЩЕСТВА**

При изпитванията за биологична разградимост на трудноразтворими вещества следва да се обърне внимание на следните аспекти.

Докато хомогенните течности рядко биха създали проблем при вземането на проба, препоръчва се твърдите материали да се хомогенизират по съответен начин, за да се избегнат грешки, дължащи се на липсата на хомогенност. Следва особено да се внимава, когато се вземат представителни проби от по няколко mg от смеси на химични вещества или от вещества, съдържащи големи количества примеси.

По време на изпитването могат да се използват различни форми на разбъркване. Следва да се използва само разбъркване дотолкова, че да се поддържа химичното вещество диспергирано, без да се стига до претопляне, образуване на много пяна или излишни сили на разкъсване.

Може да се използва емулгатор, даващ стабилна дисперсия на химичното вещество. Той следва да не е токсичен за бактериите, не следва да е биоразградим и да причинява образуване на пяна при условията на изпитването.

Същите критерии се прилагат за разтворителите, както и за емулгаторите.

Не се препоръчва използване на твърди носители при изпитване на твърди вещества, но те могат да са подходящи сами за себе си.

Когато се използват допълнителни вещества, като емулгатори, разтворители и носители, следва да се пусне контролна проба с тях.

Всеки от трите респирометрични метода за CO₂, BOD, MITI може да се използва за проучване на биоразградимостта на трудноразтворими съединения.

ПРЕПРАТКИ

- (1) de Morsier, A. et al., Biodegradation of poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.
- (2) Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

*Приложение IV***ОЦЕНКА НА БИОЛОГИЧНОТО РАЗГРАЖДАНЕ НА ВЕЩЕСТВИ,
ЗА КОИТО СЕ ПРЕДПОЛАГА/ПОДОЗИРА, ЧЕ СА ТОКСИЧНИ
КЪМ ИНОКУЛАНТА**

Когато дадено химично вещество е подложено на изпитване за лесна биоразградимост и се оказва, че не е биоразградимо, се препоръчва следната процедура, ако е желателно да се разбере дали инхибира или е инертно (Reynolds et al., 1987).

Подобни или идентичени посявки следва да се използват при изпитванията за токсичност и биологично разграждане.

За да се оцени токсичността на химичното вещество, изпитвано в изпитванията за лесна биоразградимост, изглеждат подходящи един или комбинация от следните методи: за инхибиране скоростта на дишане на активната утайка (изпитване за инхибиране респирацията на активната утайка), за BOD и/или за инхибиране на растежа.

Ако следва да се избегне инхибиране, дължащо се на токсичност, се препоръчва концентрациите на изпитваното вещество при изпитването за лесна биоразградимост да са по-ниски от 1/10 от стойностите на EC₅₀ (или по-ниски от стойностите на EC₂₀) получени при изпитването на токсичността. Съединения със стойности на EC₅₀, по-високи от 300 mg/l, не е вероятно да имат токсични ефекти при изпитването за лесна биоразградимост.

Стойности на EC₅₀, по-ниски от 20 mg/l, биха поставили сериозни проблеми при последващото изпитване. Следва да се използват ниски концентрации, които се нуждаят от използване на строгия и чувствителен метод на изолираните проби или на материал, белязан с ¹⁴C. Друга възможност е, че един аклиматизиран инокулант би позволил да се използват по-високи концентрации при изпитването. В последния случай обаче се загубва критерият за лесна биоразградимост.

ПРЕПРАТКИ

Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259

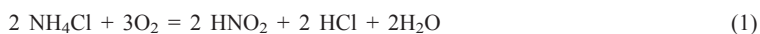


Приложение V

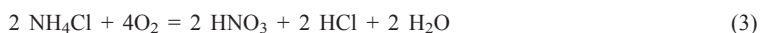
КОРЕКЦИЯ НА ПОТРЕБЛЕНИЕТО НА КИСЛОРОД ПРИ ПОВЛИЯВАНЕ ЧРЕЗ НИТРИФИКАЦИЯ

Грешките, дължащи се на факта, че не е взета предвид нитрификацията при оценката на потреблението на кислород при изпитването за биоразградимост на несъдържащи азот вещества, са незначителни (не по-големи от 5 %), даже ако окисляването на амониевия азот в средата е непостоянно както в опитните съдове, така и в съдовете с контролния инокулант. При азот-съдържащи изпитвани вещества обаче могат да възникнат сериозни грешки.

Ако е налице нитрификация, но тя не е завършена, наблюдаваното потребление на кислород в реакционната среда може да се коригира с количеството кислород, използвано за окисляване на амоняка до нитрит или нитрат. Това има място, ако промените в концентрацията на нитрити и нитрати по време на инкубацията са определени, като се отчитат следните уравнения:



Или обобщено:



От уравнение (1) потреблението на кислород от 28 g азот, съдържащ се в амониевия хлорид (NH_4Cl), който се окислява до нитрит, е 96 g, т.е. фактор 3,43 (96/28). По същият начин от уравнение (3) потреблението на кислород от 28 g азот, окислен до нитрат, е 128 g, т.е. коефициент 4,57 (128/28).

Тъй като реакциите са последователни, извършвани от отделни и различни бактериални видове, е възможно концентрацията на нитрита да се увеличава или намалява, като в последния случай може да се получи еквивалентна концентрация на нитрат. Така кислородът, консумиран за образуване на нитрат, е 4,57, умножено по увеличението на концентрацията на нитрата, докато кислородът, консумиран за образуването на нитрит, е 3,43, умножено по увеличението на концентрацията на нитрита, или с намаляването на неговата концентрация загубата на кислород е - 3,43, умножено с намаляването на концентрацията.

Това означава:

$$\text{O}_2, \text{ консумиран при образуване на нитрат} = 4,57 \times \text{увеличението на концентрацията на нитрат} \quad (4)$$

и

$$\text{O}_2, \text{ консумиран при образуване на нитрит} = 3,43 \times \text{увеличението на концентрацията на нитрит} \quad (5)$$

и

$$\text{O}_2, \text{ изгубен при преобразуването на нитрит} = - 3,43 \times \text{намалението на концентрацията на нитрит} \quad (6)$$

Така че:

$$\text{Потреблението на O}_2, \text{ дължащо се на нитрификация} = \pm 3,43 \times \text{изменението на концентрацията на нитрит} + 4,57 \times \text{увеличението на концентрацията на нитрат} \quad (7)$$

И така:

$$\text{Потреблението на O}_2, \text{ дължащо се на окисление на въглерода} = \text{общото наблюдавано потребление} - \text{потреблението, дължащо се на нитрификация} \quad (8)$$

Алтернативно, когато е определен само общият окислен N, потреблението на кислород, дължащо се на нитрификация, може да се вземе на първо приближение като $4,57 \times$ увеличението на окисления N.

Тогава коригираната стойност на консумацията на кислород, дължаща се на окисление на въглерода, след това се сравнява с ThOD NH_3 , както е изчислено в приложение II.

▼B**В.5. РАЗГРАЖДАНЕ — БИОХИМИЧНА ПОТРЕБНОСТ ОТ КИСЛОРОД****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Целта на метода е измерване на биохимичната потребност от кислород (BOD) на твърди или течни органични вещества.

Данните, получени при това изпитване, се отнасят за разтворими във вода съединения. Летливи съединения и такива с ниска разтворимост във вода могат също да се изпитват, най-малко по принцип.

Методът е приложим за изпитване на онези органични материали, които не са инхибиращи за бактерии при концентрациите, използвани при изпитването. Ако изпитваният материал не е разтворим при изпитваните концентрации, се прилагат специални мерки, като използване на ултразвук, за да се получи добро диспергиране на изпитвания материал.

При избора на подходящи концентрации на изпитване и при интерпретирането на ниски резултати може да бъде полезна информацията за токсичността на химичното вещество.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

BOD се определя като масата на разтворения кислород, необходима за определен обем от разтвора на веществото, за да извърши биохимично окисление при зададени условия.

Резултатите се изразяват като грамове BOD на грам от изпитваното вещество.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Желателно е използването на вещество за сравнение, за да се провери активността на културата.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

В предварително определено количество от веществото, разтворено или диспергирано в добре аерирана подходяща среда, се поставя култура от микроорганизми и се инкубира при определена постоянна околна температура на тъмно.

BOD се определя от разликата в съдържанието на разтворен кислород в началото и в края на изпитването. Продължителността на изпитването следва да бъде най-малко пет дни и не повече от 28 дни.

Определя се и една празна проба, пусната успоредно, но несъдържаща изпитваното вещество.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Определянето на BOD не може да се счита като валидно за определяне на биоразградимостта на дадено вещество. Това изпитване може да се разглежда само като изпитване за скрининг.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Приготвят се предварителни разтвори или дисперсии на веществото, за да се получи концентрация на БПК, подходяща за използвания метод. BOD тогава се определя, като се следва подходящ национален или международен стандартизиран метод.

▼B**2. ДАННИ И ИЗЧИСЛЕНИЯ**

БПК, съдържаща се в предварителния разтвор, се изчислява по избран стандартизиран метод и се превръща в грамове BOD на грам от изпитваното вещество.

3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Следва да се цитира използваният метод.

Биохимичната потребност от кислород следва да е средна стойност от най-малко три валидни измервания.

Цялата информация и забележките с отношение към интерпретирането на резултатите следва да се отразят в протокола, по-специално от гледище на примесите, физическото състояние, токсичните ефекти и присъщия състав на веществото, които биха повлияли на резултатите.

Използването на добавки за инхибиране на биологичната нитрификация следва да се отрази в протокола.

4. ПРЕПРАТКИ

Списък на стандартизираните методи, например:

NF T 90 -103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 32355.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B**В.6. РАЗГРАЖДАНЕ — ХИМИЧНА ПОТРЕБНОСТ ОТ КИСЛОРОД****1. МЕТОД****1.1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Целта на метода е измерване на химичната потребност от кислород (COD) на твърди или течни органични вещества по произволно избран стандартен начин при фиксирани лабораторни условия.

Информация за формулата на веществото ще бъде полезна при провеждането на настоящото изпитване и при интерпретиране на получения резултат (например соли на халогени, железни соли на органични съединения, хлорсъдържащи органични съединения).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Химичната потребност от кислород е мярка за окисляемостта на веществото, изразена като еквивалентното количество кислород на един оксидиращ агент, усвоено от веществото при фиксирани лабораторни условия.

Резултатът се изразява като грамове COD на грам от изпитваното вещество.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Не винаги, когато се изпитва ново вещество, има нужда от използване на вещества за сравнение. Те следва да служат най-вече за калибриране на метода от време на време и да позволят сравнение на резултатите, когато е приложен друг метод.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Предварително определено количество от веществото, разтворено или диспергирано във вода, се окислява на обратен хладник с калиев дихромат в силна сернокисела среда със сребърен сулфат като катализатор в продължение на два часа. Остатъчният дихромат се определя чрез титруване със стандартизиран фероамониев сулфат.

В случай на хлорсъдържащи вещества се прибавя живачен сулфат⁽¹⁾, за да се намали пречещото влияние на хлора.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Поради произволния начин на определяне COD е „индикатор за окисляемост“ и като такъв се използва като практически метод за измерване на органична материя.

Хлоридите могат да пречат на това изпитване. Неорганични редуциращи или оксидиращи агенти също могат да пречат на определянето на COD.

Някои циклични съединения и много летливи вещества (напр. нискомолекулни мастни киселини) не се окисляват напълно при това изпитване.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Предварителният разтвор или дисперсия на веществото се приготвя така, че да се получи ХПК между 250 и 600 mg/l.

⁽¹⁾ След използване разтворите, съдържащи живачни соли, следва да се обработят, за да се избегне разнасяне на живак в околната среда

▼ B*Забележки:*

В случай на трудно разтворими или недиспергиращи се вещества се претегля фина пудра от веществото или течно вещество в количество, отговарящо на 5 mg COD и се поставя в експерименталната апаратура с вода.

Химичната потребност от кислород (COD) често и специално в случай на трудно разтворими вещества се определя успешно в един вариант на метода, т.е. в затворена система с изравнител на налягането (H. Kelkenberg, 1975). При тази модификация съединения, които трудно се определят по конвенционалния метод, например оцетна киселина, могат често да бъдат успешно определени количествено. Методът, обаче не работи в случай на пиридин. Ако концентрацията на калиев дихромат, както е предписано в позоваване 1 се повиши до 0,25 N (0,0416 mol/l), директното претегляне на 5—10 mg от веществото се улеснява, което е много важно за определянето на COD на вещества, трудно разтворими във вода (позоваване 2).

От друга страна COD се определя, като се следва който и да е подходящ национален или международен стандартизиран метод.

2. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

COD, съдържаща се в експерименталната колба, се изчислява като се следва избран стандартизиран метод и се превръща в грамове COD на грам от изпитваното вещество.

3. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

В протокола се отразява използвания метод за сравнение.

Химичната потребност от кислород трябва да е средна стойност от най-малко три измервания. Цялата информация и забележки, отнасящи се до интерпретирането на резултатите, трябва да се запишат в протокола, особено отнасящите се до примесите, физично състояние, токсични ефекти и присъщи свойства на веществото (ако са известни), които биха повлияли на резултатите.

Трябва да се отрази и използването на живачен сулфат, за да се намали пречещото влияние на хлоридите.

4. ПРЕПРАТКИ

- (1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.
- (2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13,169.

Списък на стандартизирани методи, например:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B**В.7. РАЗГРАЖДАНЕ — АБИОТИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ:
ХИДРОЛИЗА КАТО ФУНКЦИЯ ОТ pH****1. МЕТОД**

Настоящият метод на изпитване е еквивалентен на метода TG 111 (2004) на ОИСР.

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Химичните вещества могат да проникнат в повърхностните води по такива начини като директното прилагане, отнасяне на спрей при пръскане, повърхностен отток, дренажни води, депониране на отпадъци, промишлени, битови или селскостопански отпадъчни води и отлагания от атмосферата и могат да се преобразуват в тези води от химични (напр. хидролиза, окисление), фотохимични и/или микробиологични процеси. Тези насоки описват лабораторен изпитателен метод за оценка на абиотично хидролитично преобразуване на химичните вещества във водни системи при стойности на pH, които се срещат обикновено в околната среда (pH 4—9) и е на основата на съществуващи ръководства (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

Опитите са проведени, за да се определи i) степента на хидролиза на изпитваното вещество като функция на pH и ii) същността или природата и степента на образуване и разпадане на продукти на хидролиза, на които могат да бъдат изложени организмите. Такива проучвания може да се изискват за химични вещества, които се прилагат директно към водата или за които има вероятност да стигнат до околната среда по другите пътища, описани по-горе.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ЕДИНИЦИ

Вж. приложение 2.

1.3. ПРИЛОЖИМОСТ НА МЕТОДА

Изпитването е общоприложимо за химични вещества (маркирани или немаркирани), за които съществува достатъчно точен и чувствителен аналитичен метод. Приложим е за слабо летливи и нелетливи съединения, достатъчно разтворими във вода. Изпитването не трябва да се прилага при химични вещества, които са силно летливи във вода (напр. фумиганти, органични разтворители) и по тази причина не могат да бъдат запазени в разтвор съгласно условията на изпитване за настоящото изпитване. Провеждането на изпитването с вещества, които са много слабо разтворими във вода е възможно да бъде трудно (8).

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

Стерилни водни буферни разтвори с различни pH стойности (pH 4, 7 и 9) се обработват с веществото на изпитване и се инкубират на тъмно при контролирани лабораторни условия (при постоянна температура). След подходящи интервали време буферните разтвори се изследват за изпитваното вещество и за продукти на хидролиза. С маркирано вещество на изпитване (напр. с ¹⁴C) масовият баланс може да се извърши по-лесно.

Настоящият метод на изпитване е замислен като стъпален подход, който е показан и обяснен в приложение 1. Всяка стъпало резултати е предизвикано от резултатите от предходното стъпало.

▼B

1.5. ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

За измерване на степента на хидролиза може да бъде използвано немаркирано или маркирано вещество на изпитване. Като цяло за изучаване на пътя, по който протича хидролизата и за извършване на масовия баланс се предпочитат маркиран материал; все пак в специални случаи маркирането може да не е абсолютно необходимо. Маркирането с ^{14}C е препоръчително, но използването на други изотопи като ^{13}C , ^{15}N , ^3H също може да бъде полезно. Доколкото е възможно, маркирането трябва да стане в най-стабилната(ите) част(и) на молекулата. Например, ако веществото на изпитване съдържа един пръстен, необходимо е да се маркира този пръстен; ако веществото на изпитване съдържа два или повече пръстена, може да се наложат отделни изследвания, за да се определи участта на всички маркирани пръстени и да се получи подходяща информация за формирането на хидролизни продукти. Чистотата на изпитваното вещество трябва да е най-малко 95 %.

Преди извършване на изпитването на хидролиза, трябва да е налична следната информация за изпитваното вещество:

- а) разтворимост във вода [Метод на изпитване А.6];
- б) разтворимост в органични разтворители;
- в) налягане на парите [Метод на изпитване А.4] и/или константа от закона на Хенри;
- г) коефициент на разпределение п-октанол/вода [Метод на изпитване А.8];
- д) константа на дисоциация (pK_a) [Ръководство на ОИСП 112] (9);
- е) там където е необходимо, степен на пряка и непряка фото-трансформация във вода.

Трябва да са налични аналитични методи за количествено определяне на изпитваното вещество и, ако е необходимо за откриване и количествено определяне на хидролизни продукти във водни разтвори (вж. също точка 1.7.2).

1.6. ВЕЩЕСТВА ЕТАЛОНИ

Там където е възможно, трябва да се използват еталонни вещества за откриване и количествено определяне на хидролизни продукти чрез спектроскопски и хроматографски методи или други методи с подходяща чувствителност.

1.7. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

1.7.1. Аналитичен добив

Анализ на поне два буферни разтвора или на екстрактите им веднага след добавянето на изпитваното вещество дава първите показания за повторемостта на аналитичния метод и за еднородността на процедурата на прилагане за изпитваното вещество. Аналитичните добиви на химичните вещества на по-късни етапи от експериментите се получават от съответните масови баланси (когато е използван маркиран материал). Аналитичните добиви трябва да са в границите 90 %—110 % за маркирани и немаркирани химични вещества (7). В случай, че е технически трудно да се постигне този порядък, за немаркирани материали може да се приеме аналитичен добив от 70 %, но трябва да се придружи с обяснение.

▼B**1.7.2. Повторяемост и чувствителност на аналитичния метод**

Повторяемостта на аналитичния(ите) метод(и), използван(и) за количествено определяне на изпитваното вещество и хидролизни продукти по-късно може да бъде проверена чрез повторен анализ на същите буферни разтвори (или на техните екстракти), след като са се формирали достатъчни количества хидролизни продукти за количествено определяне.

Аналитичният метод трябва да е достатъчно чувствителен, за да бъдат определени количествено концентрациите на изпитваното вещество до 10 % или по-малко от първоначалната концентрация. Ако е необходимо, аналитичните методи също трябва да са достатъчно чувствителни за количествено определяне на хидролизни продукти, които представляват 10 % или повече от приложеното вещество (по всяко време на изследването) и до 25 % или по-малко от максимално достигнатата концентрация

1.7.3. Интервали на доверие на кинетичните данни на хидролизата

Интервалите на доверие следва да бъдат изчислени и представени за всички коефициенти на регресия, скоростни константи, времена на полуразпад и други кинетични параметри (напр. DT50).

1.8. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ**1.8.1. Оборудване и прибори**

Изследването следва да се проведе в стъклени съдове (напр. епруветки, малки колби), ако е необходимо на тъмно и при условия на стерилност, освен ако предварителна информация (като коефициентът на разпределение п-октанол-вода) не показва, че изпитваното вещество може да се полепи по стъклото. В такива случаи могат да се използват алтернативни материали (като тефлон). Може да е възможно и намаляване на проблема от полепването по стъкло, като се използва един от следните методи:

- определяне на теглото на изпитваното вещество и на хидролизните продукти, получени чрез сорбция в съда на провеждане на изпитването;
- използване на ултразвукова вана;
- измиване с разтворител на цялата стъклария при всеки интервал на взимане на проби;
- използване на формулирани продукти;
- използване на увеличено количество съразтворител при добавянето на изпитвано вещество в системата, ако се използва съразтворител, той трябва да е такъв, който не хидролизира изпитваното вещество.

За процеса на инкубиране на различни разтвори на изпитване обикновено са необходими шейкъри с контролирана температура на водната баня или инкубатори с термостат.

Необходимо е стандартно лабораторно оборудване, особено, следното:

- рН-метър;

▼ B

- аналитични инструменти като GC, HPLC и TLC, включително подходящи системи за откриване за анализиране на радиоактивно маркирани и немаркирани вещества или метод за обратно изотопно разреждане;
- инструменти за целите на определяне (напр. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR и др.);
- течен сцинтилационен брояч;
- разделителни фунии за екстракция течност—течност;
- апарати за концентриране на разтвори и екстракти (напр. ротационен изпарител);
- уред за контролиране на температурата (напр. водна баня).

Химичните реагенти включват например:

- органични разтворители, аналитично чисти, напр. хексан, дихлорметан и др.;
- сцинтилационна течност;
- буферни разтвори (за подробности вж. точка 1.8.3).

Цялата стъклария и отговарящите на стандартите за реагенти вода и буферни разтвори, които ще се използват в хидролизните опити, трябва да бъдат стерилизирани.

1.8.2. Прилагане на изпитваното вещество

Изпитваното вещество се прилага като воден разтвор към различни буферни разтвори (вж. приложение 3). Ако е необходимо, за подходящо разтваряне е разрешено използването на малки количества на добре разтворими във вода разтворители (като ацетонитрил, ацетон, етилов алкохол) за прилагане или разпределение на изпитваното вещество, но това обикновено не трябва да надхвърля 1 % v/v. В случай на предвидена висока концентрация на разтворителите (напр. в случая на слабо разтворими вещества на изпитване), това може да се разреши единствено когато е възможно да се покаже, че разтворителят не оказва ефект върху хидролизата на изпитваните вещества.

Използването на приготвени по формула продукти не е препоръчвано рутинно, тъй като не може да се изключи, че съставките, участващи във формулата на приготвяне, могат да повлияят процеса на хидролиза. Все пак, използването на материал, приготвен по формула може да е подходяща алтернатива за лошо разтворими във вода вещества или за вещества, които полепват по стъкло (виж точка 1.8.1).

Трябва да се използва концентрация на изпитваното вещество, която не превишава 0,01 M или половината от концентрацията на насищане (вж. приложение 1).

▼B**1.8.3. Буферни разтвори**

Изпитването на хидролиза следва да се провежда при стойности на рН от 4, 7 и 9. За целта буферният разтвор следва да се приготви, като се използват химически вещества и вода, отговарящи на стандартите реагенти. Някои полезни буферни системи са представени в приложение 3. Следва да се отбележи, че използваната буферна система може да повлияе на степента на хидролиза и където това се наблюдава, трябва да се използва друга буферна система ⁽¹⁾.

рН на всеки буферен разтвор следва да се провери с калибриран рН-метър с точност до 0,1 при изискваната температура.

1.8.4. Условия на изпитване**1.8.4.1. Температура на изпитване**

Опитите за хидролиза следва да се провеждат при постоянна температура. За целите на екстраполиране е важно температурата да съответства най-малко до $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Ако хидролитичното поведение на изпитваното вещество е неизвестно, следва да се проведе предварително изпитване (стъпало 1) при температура 50°C . Кинетични изпитвания на по-високо стъпало следва да се провеждат при минимален брой от три температури (включително изпитването при 50°C), освен ако изпитваното вещество е стабилно на хидролиза, определено при изпитването на стъпало 1. Предложения температурен диапазон е $10\text{—}70^{\circ}\text{C}$ (като за предпочитане е да се използва поне една температура под 25°C), което ще обхване температурата от 25°C , използвана в доклада от изпитването, и повечето температури, срещани на терена.

1.8.4.2. Светлина и кислород

Всички хидролизни изпитвания следва да се проведат, като се използва подходящ метод, за да се избегне фотолиза. Следва да се вземат всички подходящи мерки, за да се избегне кислорода (напр. барботиране на хелий, азот или аргон в продължение на 5 минути преди приготвянето на разтвора).

1.8.4.3. Продължение на изпитването

Предварителното изпитване следва да се проведе в продължение на 5 дни, а изпитванията на по-високо стъпало следва да се продължават, докато изпитваното вещество се хидролизира до 90 % или в продължение на 30 дни, в зависимост от това кое събитие ще настъпи първо.

1.8.5. Провеждане на изпитването**1.8.5.1. Предварително изпитване (стъпало 1)**

Предварителното изпитване се провежда при $50 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ и рН 4,0, 7,0 и 9,0. Ако след 5 дни се наблюдава хидролиза, по-малка от 10 процента ($t_{0,5_{25^{\circ}\text{C}}} > 1$ година), изпитваното вещество се счита хидролитично стабилно и обикновено не се изискват допълнителни изпитвания. Ако за веществото се знае, че е нестабилно при температури, срещани в околната среда ⁽²⁾, тогава не се изисква предварително изпитване. Аналитичният метод трябва да е достатъчно точен и чувствителен, за да може да открие намаление от 10 процента на първоначалната концентрация.

⁽¹⁾ Мабей и Мил препоръчват използването на боратен или ацетатен буфер вместо фосфатен (11).

⁽²⁾ Такава информация може да се получи от други източници като данни за хидролизата на съединения с подобен строеж от литературни източници или други предварителни, полуколичествени изпитвания за хидролиза на изпитваното вещество на по-ранен етап на развитие.

▼B1.8.5.2. *Хидролиза на нестабилни вещества (стъпало 2)*

Изпитване на по-високо стъпало (напреднало) следва да се проведе при стойностите на рН, при които изпитваното вещество се е показало нестабилно, както е определено от предварителното изпитване по-горе. Температурата на буферните разтвори на изпитваното вещество следва да се поддържа термостатно на избраните стойности. За да се провери дали реакцията е от първи порядък, всеки разтвор следва да се анализира през интервали време, които образуват минимум шест раздалечени точки, обикновено между 10 % и 90 % хидролизирани на изпитваното вещество. Следва да се вземат проби за повторно изпитване (минимум две еднакви проби, държани в отделни съдове на реакция) и съдържанието им да се анализира при всеки от поне шестте интервала за взимане на проби (за получаване на поне дванадесет точки с данни от повторно изпитване). Използването на еднообемна проба, от която да се вземат отделните аликвотни части от изпитваното вещество при всеки интервал на изпитване, се счита за неподходящо, тъй като не позволява анализ на варирането на данните и може да доведе до проблеми от замърсяване на изпитваното вещество. Изпитване за потвърждаване на стерилността следва да се проведат на края на изпитването от по-високо стъпало (т.е. при 90 % хидролиза или 30 дни). Все пак, ако не наблюдава разпадане (т.е. трансформиране), изпитването за стерилност не се счита за необходимо.

1.8.5.3. *Определяне на продуктите от хидролизата (стъпало 3)*

Всеки основен продукт от хидролиза, поне тези представляващи > 10 % от приложената доза, следва да бъде определен с подходящи аналитични методи.

1.8.5.4. *Изпитвания по избор*

Може да са необходими допълнителни изпитвания при стойности на рН, различни от 4, 7 и 9 за хидролитично неустойчиви изпитвани вещества. Например за физиологични цели може да е необходимо изпитване при условия с по-висока киселинност (напр. рН 1,2), като се използва една физиологично подходяща температура (37 °C).

2. ДАННИ

Ако е възможно, количествата на изпитваното вещество и на продуктите от хидролизата, следва да се представят като процент от приложената първоначална концентрация и когато е подходящо, като mg/L за всеки интервал на взимане на проби и за всяко рН и температура на изпитване. В допълнение, масовият баланс следва да се представи в проценти от първоначално приложената концентрация, когато е използвано маркирано вещество на изпитване.

Следва да се покаже графично представяне на превърнатите в логаритмична форма данни за концентрациите на изпитваното вещество по посока на времето. Всички основни хидролизни продукти или поне тези представляващи $\geq 10\%$ от приложената доза следва да се определят и техните логаритмични концентрации да се нанесат графично по същия начин както на главното вещество, с цел да се покаже тяхната степен на формиране и намаляване.

▼ B

2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

По-точно определяне на времената на полуразпад или стойностите на DT_{50} следва да се получи чрез изчисляване подходящия кинетичен модел. Времето на полуразпад и/или стойностите на DT_{50} (включително интервала на доверие) следва да се докладват за всяко рН и температура, заедно с описание на използвания модел, порядъка на кинетиката и коефициента на определяне (r^2). Ако е подходящо, изчисленията следва да се приложат и към хидролизните продукти.

В случая на изследвания за скорост на реакцията, проведени при различни температури, константите за скорост на хидролизата от псевдо първи порядък (k_{obs}), следва да бъдат описани като функция от температурата. Изчисляването следва да е въз основа както на разделянето на k_{obs} на скоростни константи за киселинно катализирани, неутрални и основно катализирани процеси на хидролиза (k_H , $k_{неутрален}$, и $k_{ОН}$), така и на уравнението на Арениус:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{неутрал} + k_{ОН}[OH^-] = \sum_{i=H, неутрален, ОН} A_i e^{-B_i/T}$$

където A_i и B_i са константите на регресия в мястото на пресичане на координатната ос и на наклона съответно на най-добре съответстващите линии, образувани от линейно намаляващия $\ln k_i$ за реципрочната стойност на абсолютната температура по Келвин (T). Чрез използването на уравненията на Арениус за киселинно, неутрални и основно катализирани процеси на хидролиза скоростните константи на реакции от псевдо първи порядък, и по този начин времената на полуразпад, могат да се изчислят за други температури, за които прякото опитно определяне на скоростна константа не е практически осъществимо (10).

2.2. ОЦЕНКА И ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Повечето реакции на хидролиза следват видимо скорости на реакции от първи порядък, поради което времената на полуразпад са независими от концентрацията (вж. уравнение 4 в приложение 2). Това обикновено позволява прилагането на лабораторни резултати, получени в рамките на 10^{-2} до 10^{-3} M, към природни условия ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Няколко примера за добро съвпадение на скорости на хидролиза, измерени в чиста вода и в природни води за различни химични вещества, са докладвани от Мабей и Мил (11), при условие правилно са измерени рН и температурата.

3. ДОКЛАДВАНЕ

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването трябва да включва най-малко следната информация:

Изпитвано вещество:

- тривиално наименование, химично наименование, номер по CAS, структурна формула (включително място на маркера, когато се използва радиоактивно маркиран материал) и съответните физико-химични свойства (вж. точка 1.5);
- чистота (примеси) на изпитваното вещество;
- чистота на маркера на маркираното химично вещество и моларна активност (където е необходимо).

▼B

- Буферни разтвори;
- дати и подробности на приготвяне;
- използвани буфери и води;
- моларност и рН на буферните разтвори.

Условия на изпитване:

- дати на провеждане на изследванията;
- количество приложено изпитвано вещество;
- метод и разтворители (тип и количество), използвани за прилагането на изпитваното вещество;
- обем на разтворите на изпитваното вещество с буфер, подложени на инкубиране;
- описание на използваната система за инкубиране;
- рН и температура по време на изследването;
- времена на взимане на проби;
- метод(и) на екстракция;
- методи на количествено определяне и идентифициране на изпитваното вещество и хидролизните му продукти в буферните разтвори;
- брой повторни изследвания.

Резултати:

- повторяемост и чувствителност на използваните аналитични методи;
- аналитични добиви (процентните стойности за валидно проучване са посочени в точка 1.7.1);
- данни от повторните изпитвания и средни стойности, показани във вид на таблица;
- масов баланс по време и в края на изследванията (когато са използвани маркирани вещества на изпитване);
- резултати от предварителното изпитване;
- обсъждане и тълкуване на резултатите;
- всички изходни данни и цифри.

Следната информация е необходима само ако се определя скоростта на хидролиза:

- графично отбелязване на концентрациите по отношение на времето за веществата на изпитване и, където е необходимо, за хидролизните продукти при всяка стойност на рН и температурата;
- таблици с резултати от уравнението на Арениус за температура 20 °C/25 °C с рН, скоростна константа [час^{-1} или ден^{-1}], време на полуразпад или DT_{50} , температура [°C], включително интервала на доверие и коефициентните на корелация (r^2) или подобна информация;
- предложен път на хидролиза.

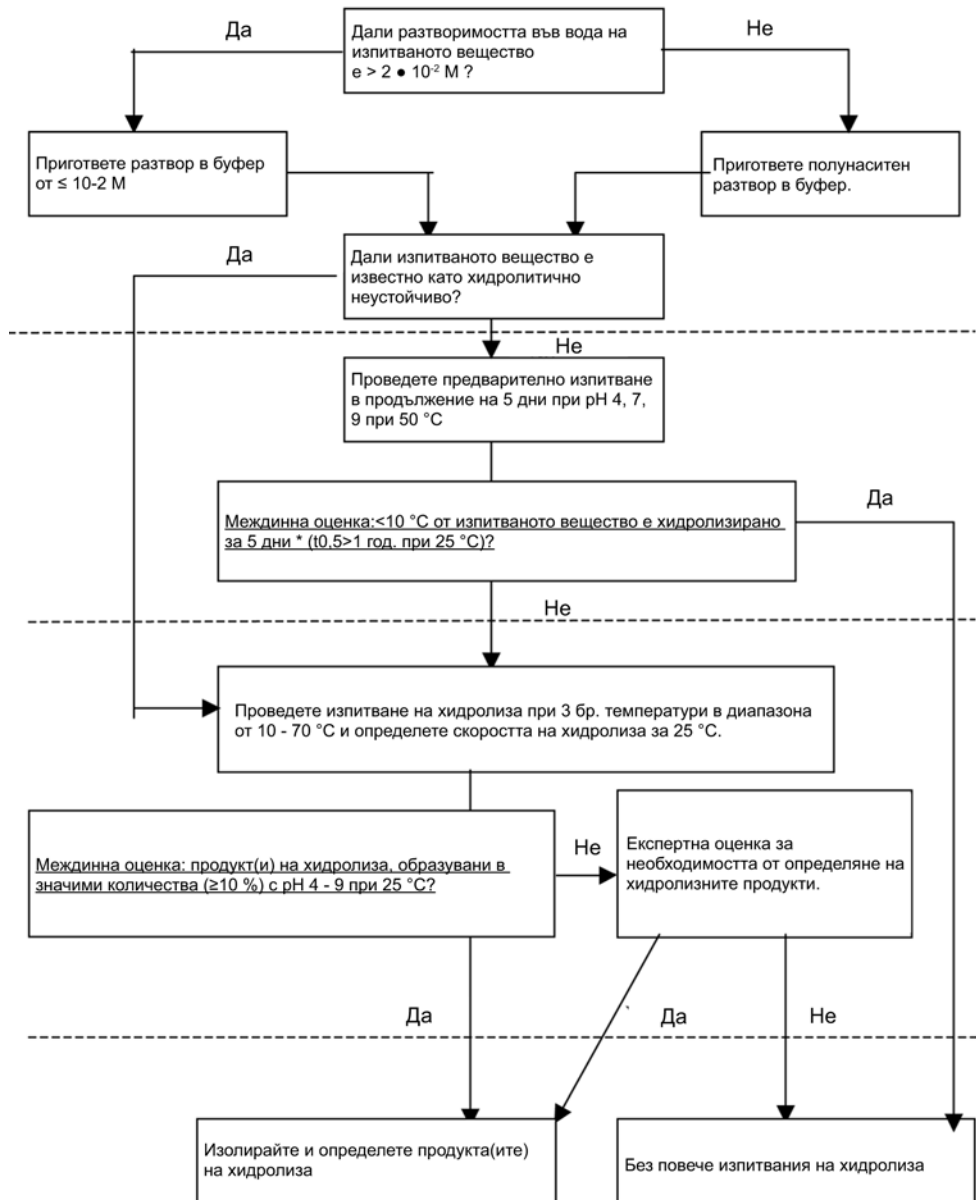
▼B4. **ПРЕПРАТКИ**

1. ОИСП (1981 г.). Хидролиза като функция от Ph. Насоки на ОИСП за изпитването на химически вещества № 111, приети на 12 май 1981 г.
2. US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
3. Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.
4. Европейски Съюз (ЕС) (1995 г.). Директива 95/36/ЕО на Комисията за изменение на Директива 91/414/ЕИО на Съвета относно пускането на пазара на продукти за растителна защита. Приложение V: Съдба и поведение в околната среда.
5. Нидерландска комисия за регистрация на пестициди (1991 г.). Кандидатстване за регистриране на пестицид. Раздел G: Поведение на продукта и метаболитите му в почва, вода и въздух.
6. BVA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (октомври 1980 г.).
7. SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
8. ОИСП (2000 г.). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr. 23.
9. ОИСП (1993 г.). Насоки за изпитването на химични вещества, Париж, ОИСП (1994—2000 г.): Допълнение 6-11 към Насоки за изпитването на химични вещества.
10. Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).
11. Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.



Приложение 1

Схема на изпитване за стъпална хидролиза



10 % хидролизиране на изпитваното вещество при 50 °С съответства на период на полуразпад от пригл. 30 дни, което съответства на пригл. 1 година при 25 °С.

▼ B*Приложение 2***Дефиниции и единици**

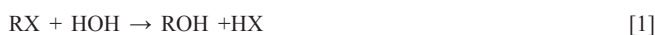
Следва да се използват единиците от **Международната система единици (SI)**.

Изпитвано вещество: всяко вещество, независимо дали е основното вещество или съответните продукти на преобразуване.

Продукти на трансформация: всички вещества, получени в резултат на биотична или абиотична реакции на преобразуване на изпитваното вещество.

Хидролизни продукти: всички вещества, получени в резултат на хидролитично преобразуване на изпитваното вещество.

Хидролиза се отнася за реакция на вещество на изпитване RX с вода при чиста замяна на групата X с OH, съгласно реакцията:



Скоростта с която концентрацията на RX намалява в този опростен процес се дава чрез:

$$\text{скорост} = k [\text{H}_2\text{O}] [\text{RX}] \quad \text{реакция от втори порядък}$$

или

$$\text{скорост} = k [\text{RX}] \quad \text{реакция от първи порядък}$$

в зависимост от стъпката за определяне на скоростта. Поради присъствието на вода в много по-големи количества, отколкото изпитваното вещество, този тип реакция обикновено се описва като реакция от псевдо първи порядък, в която наблюдаваната скоростна константа е дадена със следната формула:

$$k_{\text{obs}} = k[\text{H}_2\text{O}] \quad [2]$$

и може да бъде определена от израза (*)

$$k_{\text{obs}} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_0}{C_t} \quad [3]$$

където

t = време

и C₀, C_t = концентрации на RX във време 0 и t.

Единиците на тази константа имат дименсия от (време)⁻¹ и времето на полуразпад на реакцията (времето за което 50 % от RX ще реагира) се дава с:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{\text{obs}}} \quad [4]$$

Време на полуразпад: (t_{0,5}) е времето, за което 50 % от изпитваното вещество е претърпяло хидролиза, когато реакцията може да се опише като кинетика от първи порядък; то е независимо от концентрацията.

(*) Ако нанасянето на логаритмичните данни спрямо времето не показва линейна функция (равна на реакция от първи порядък), то използването на уравнение [3] не е подходящо за определяне на скоростната константа на хидролиза на изпитваното съединение.

▼B

DT₅₀ (Време на изчезване 50): е времето, за което концентрацията на изпитваното вещество е намаляла с 50 %; то е различно от времето на полуразпад $t_{0,5}$, когато реакцията не протича при кинетика от първи порядък.

Оценка на k при различна температура

Когато скоростните константи са известни за две температури, скоростните константи при други температури могат да се изчислят, като се използва уравнението на Арениус:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ или } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Нанасянето на $\ln k$ спрямо на $1/T$ образува права линия с наклон $-E/R$

където:

k = скоростна константа, измерена при различни температури

E = енергия на активация [kJ/mol]

T = абсолютна температура [K]

R = газова константа [8,314 J/mol.K]

Енергията на активация е изчислена чрез регресивен анализ или чрез следното уравнение:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

където: $T_2 > T_1$



Приложение 3

Буферни системи

A. CLARK и LUBS:

Буферни смеси на CLARK и LUBS (*)

Състав	pH
0,2 N HCl и 0,2 N KCl при 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl разреден до 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl разреден до 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl разреден до 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl разреден до 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl разреден до 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl разреден до 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl разреден до 100 ml	2,2
0,1 M калиев бифталат + 0,1 N HCl при 20 °C	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталат до 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталат до 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталат до 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталат до 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталат до 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталат до 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталат до 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталат до 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml бифталат до 100 ml	3,8
0,1 M калиев бифталат + 0,1 N NaOH при 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталат до 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталат до 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталат до 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталат до 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталат до 100 ml	4,8

(*) Стойностите на pH, докладвани в таблиците, са изчислени от измерване на потенциала, като са използвани стандартните уравнения на Sørensen (1909 г.). Съответните стойности на pH са с 0,04 единици по-високи, отколкото табличните стойности.

▼B

Състав	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталат до 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталат до 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталат до 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталат до 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталат до 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml бифталат до 100 ml	6,0

Буферни смеси на CLARK и LUBS (продължение)

0,1 М монокалий фосфат + 0,1 N NaOH при 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфат до 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфат до 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфат до 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфат до 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфат до 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфат до 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфат до 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфат до 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфат до 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфат до 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml фосфат до 100 ml	8,0
0,1 М Н₃ВO₃ в 0,1 М KCl + 0,1 N NaOH при 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борна киселина до 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борна киселина до 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борна киселина до 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борна киселина до 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борна киселина до 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борна киселина до 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борна киселина до 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борна киселина до 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борна киселина до 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борна киселина до 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борна киселина до 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml борна киселина до 100 ml	10,0

Б. KOLTHOFF и VLEESCHHOUWER:**Цитратни буфери на KOLTHOFF и VLEESCHHOUWER**

Състав	pH
0,1 М монокалциев нитрат и 0,1 N HCl при 18°C (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml нитрат до 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml нитрат до 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml нитрат до 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml нитрат до 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml нитрат до 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml нитрат до 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml нитрат до 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml нитрат до 100 ml	3,6
0,1 М монокалциев цитрат и 0,1 N NaOH при 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрат до 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрат до 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрат до 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрат до 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрат до 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрат до 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрат до 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрат до 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрат до 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрат до 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрат до 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml цитрат до 100 ml	6,0

(*) Добавете малки кристали тимол или сходно вещество, за да предотвратите появата на мухъл.

▼ B

B. SÖRENSEN:

Боратни смеси на SORENSEN

Състав		Sørensen 18 °C	Walbum, pH при		
ml боракс	ml HCl/N аОН		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 М боракс + 0,1 N HCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,0	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 М боракс + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Фосфатни смеси на SÖRENSEN

Състав	pH
0,0667 М монокалиев фосфат + 0,0667 М динатриев фосфат при 20 °C	
99,2 ml KH ₂ PO ₄ + 0,8 ml Na ₂ HPO ₄	5,0
98,4 ml KH ₂ PO ₄ + 1,6 ml Na ₂ HPO ₄	5,2
97,3 ml KH ₂ PO ₄ + 2,7 ml Na ₂ HPO ₄	5,4
95,5 ml KH ₂ PO ₄ + 4,5 ml Na ₂ HPO ₄	5,6
92,8 ml KH ₂ PO ₄ + 7,2 ml Na ₂ HPO ₄	5,8
88,9 ml KH ₂ PO ₄ + 11,1 ml Na ₂ HPO ₄	6,0
83,0 ml KH ₂ PO ₄ + 17,0 ml Na ₂ HPO ₄	6,2
75,4 ml KH ₂ PO ₄ + 24,6 ml Na ₂ HPO ₄	6,4
65,3 ml KH ₂ PO ₄ + 34,7 ml Na ₂ HPO ₄	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0



V.8. ТОКСИЧНОСТ ЗА ЗЕМНИ ЧЕРВЕИ.

ИЗПИТВАНЕ С ИЗКУСТВЕНА ПОЧВА

1. МЕТОД

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

При това лабораторно изпитване изпитваното вещество се добавя към изкуствена почва, в която за 14 дни се поставят земни червеи. След този период (и, по желание, след 7 дни) се изпитва леталният ефект на веществото върху земните червеи. Изпитването осигурява метод за относително краткотрайно пресяващо изпитване за ефекта на химическите вещества върху земните червеи, чрез постъпване по кожен и стомашно-чревен път.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ЕДИНИЦА

LC₅₀: Концентрацията на дадено вещество, за която е преценено, че убива 50 % от експерименталните животни през периода на изпитването.

1.3. ВЕЩЕСТВО ЗА СРАВНЕНИЕ

Периодично се използва вещество за сравнение се използва периодично за да се демонстрира, че чувствителността на експерименталната система не е значително променена.

Като вещество за сравнение се препоръчва хлороацетамид „чист за анализ“.

1.4. ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

Почвата е непостоянна среда, така че за това изпитване се използва точно определена изкуствена глинеста почва. Възрастните земни червеи от вида *Eisenia foetida* (вижте забележката в приложението) се държат в определена изкуствена почва, третирана с различни концентрации на изпитваното вещество. Съдържанието на контейнерите се разстила на табла 14 дни (и, по желание, 7 дни) след началото на изпитването и се преброяват преживелите при всяка концентрация земни червеи.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Изпитването е проектирано така, че да бъде възможно най-добре възпроизводимо по отношение на изпитвания субстрат и организъм. В края на изпитването смъртността при контролите не трябва да превишава 10 %, в противен случай изпитването е невалидно.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

1.6.1. Материали

1.6.1.1. Експериментален субстрат

Като основен експериментален субстрат се използва определена изкуствена почва.

а) Основен субстрат (процентите са по отношение на сухото тегло)

— 10 % торфен мъх (с рН възможно най-близо до 5,5—6,0 без видими остатъци от растения и фино смян),

▼B

- 20 % каолин, за предпочитане с повече от 50 % каолинит,
- около 69 % промишлен кварцов пясък (преобладава финият пясък с над 50 % частици с размер 0,05 до 0,2 mm). Ако веществото не се диспергира достатъчно във вода, трябва да се подържат по 10 g за експериментален контейнер за по-късно смесване с изпитваното вещество.
- около 1 % калциев карбонат (CaCO_3), пулверизиран, химически чист, добавен за постигане на pH 6,0 + 0,5.

б) Експериментален субстрат

Експерименталният субстрат съдържа основния субстрат, изпитваното вещество и дейонизирана вода.

Водното съдържание е около 25 до 42 % от сухото тегло на основния субстрат. Водното съдържание на субстрата се определя чрез изсушаване на проба до постоянно тегло до около 25 до 42 % от сухото тегло на основния субстрат при 105 °C. Най-важният критерий е, че изкуствената почва трябва да бъде навлажнена до степен, при която няма остатъчна вода. Трябва да се внимава при смесването да се получи равномерно разпределяне на изпитваното вещество и на субстрата. Трябва да се отбележи начинът на въвеждане на изпитваното вещество в субстрата.

в) Контролен субстрат

Контролният субстрат съдържа основния субстрат и вода. Ако се използва добавка, една допълнителна контрола трябва да съдържа същото количество от добавката.

1.6.1.2. Експериментални контейнери

Състеклени контейнери с обем около един литър (адекватно затворени с пластмасови капаци, панички или пластмасов филм с вентилационни отвори), напълнени с определено количество влажен експериментален или контролен субстрат, еквивалентен на 500 g сухо тегло на субстрата.

1.6.2. Условия на изпитване

Контейнерите трябва да се държат в климатични камери при температура 20 ± 2 °C с непрекъснато осветяване. Интензивността на светлината трябва да бъде 400 до 800 лукса.

Изпитването трае 14 дни, но, по желание, смъртността може да бъде отчетена седем дни след началото на изпитването.

1.6.3. Експериментална процедура

Експериментални концентрации

Концентрациите на изпитваното вещество се изразяват като тегло на веществото за единица сухо тегло на основния субстрат (mg/kg).

Изпитване за определяне на диапазон

Диапазонът на концентрациите, които предизвикват смъртност в 0 до 100 % може да бъде определен с помощта на изпитване за определяне на диапазон, което да даде информация за диапазона на концентрациите, които да се използват в дефинитивното изпитване.

▼B

Веществото трябва да бъде изпитвано при следните концентрации: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg вещество/килограм експериментален субстрат (сухо тегло).

Когато трябва да се проведе пълно дефинитивно изпитване, за изпитването за определяне на диапазон може да са достатъчни по една експериментална партида за концентрация и по една за нетретирания контрола, всяка с по 10 червея.

Дефинитивно изпитване

Резултатите от изпитването за определяне на диапазон се използват за избиране на поне пет концентрации в геометрична серия, които покриват диапазона от 0 до 100 % смъртност и които се различават с постоянен фактор, непревишаващ 1,8.

Изпитванията, при които се използват тези серии от концентрации, трябва да дават възможно най-точна оценка на стойността LC_{50} и нейните граници на доверителност.

При дефинитивното изпитване се използват най-малко по четири експериментални партиди за концентрация и четири нетретирани контроли, всяка с по 10 червея. Резултатите от тези повторения се представят като средна стойност и стандартно отклонение.

Когато две последователни концентрации в съотношение 1,8 дават само 0 % и 100 % смъртност, тези две стойности са достатъчни, за да покажат диапазона, в рамките на който попада LC_{50} .

Смес от основния експериментален субстрат и изпитваното вещество

Винаги когато е възможно, експерименталният субстрат трябва да бъде приготвен без никакви допълнителни средства, освен вода. Непосредствено преди началото на изпитването изпитваното вещество се емулгира или диспергира в дейонизирана вода или друг разтворител и се смесва с основния експериментален субстрат или се разпръсква равномерно върху него с фин хроматографски или друг подобен спрей.

Ако е неразтворимо във вода, изпитваното вещество може да бъде разтворено във възможно най-малък обем подходящ органичен разтворител (например хексан, ацетон или хлороформ).

За разтваряне, диспергиране или емулгиране на изпитваното вещество могат да се използват само средства, които лесно се изпаряват. Преди употреба експерименталният субстрат трябва да бъде вентилиран. Количеството изпарена вода трябва да бъде възстановено. Контролата трябва да съдържа същото количество от всяка добавка.

Ако изпитваното вещество е неразтворимо и не може да се диспергира или емулгира в органични разтворители, 10 g смес от фино смлян кварцов пясък и определено количество изпитвано вещество, което е необходимо за третиране на 500 g сухо тегло от изкуствената почва, се смесват с 490 g сухо тегло от експерименталния субстрат.

За всяка експериментална партида във всеки стъклен контейнер се поставя определено количество влажен експериментален субстрат, еквивалентен на 500 g сухо тегло, заедно с 10 земни червея, които са аклиматизирани за 24 часа с сходен влажен основен субстрат и после са измити бързо, като излишната вода е абсорбирана с филтърна хартия преди използването им, и след това са поставени на повърхността на експерименталния субстрат.

▼ B

Контейнерите се покриват с перфорирани пластмасови капаци, панички или филм, за да се предотврати изсъхването на субстрата, и се държат при експериментални условия в продължение на 14 дни.

Отчитането трябва да се направи 14 дни (и, по желание, седем дни) след започване на изпитването. Субстратът се разстила върху плочка, направена от стъкло или неръждаема стомана. Земните червеи се изследват и се определя броят на преживелите червеи. Земните червеи се смятат за мъртви, ако не реагират на лек механичен стимул в предния край.

Когато на седмия ден се прави изследване, контейнерът отново се напълва със субстрат и преживелите червеи отново се поставят върху повърхността на същия експериментален субстрат.

1.6.4. *Експериментални организми*

Експерименталните организми трябва да бъдат възрастни индивиди от вида *Eiseniafoetida* (виж забележката в допълнението) (на възраст поне два месеца с „поясче“) с влажно тегло 300 до 600 mg. (За метода на отглеждане виж допълнението).

2. ДАННИ

2.1. ТРЕТИРАНЕ И ОЦЕНКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Концентрациите на изпитваното вещество се отчитат чрез препратка към съответните проценти на умрели земни червеи.

Когато данните са адекватни, стойността LC_{50} и границите на доверителност ($p = 0,05$) трябва да се определят с помощта на стандартни методи (Litchfield и Wilcoxon, 1949, за еквивалентен метод). Стойността LC_{50} трябва да бъде представена като mg изпитвано вещество за килограм от експерименталния субстрат (сухо тегло).

Когато наклонът на кривата на концентрацията е прекалено стръмен, за да позволи изчисляване на LC_{50} , достатъчна е графична оценка на тази стойност.

Когато две последователни концентрации в съотношение 1,8 дават само 0 % и 100 % смъртност, тези две стойности са достатъчни, за да покажат диапазона, в рамките на който попада LC_{50} .

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Ако е възможно, протоколът от изпитването съдържа следното:

- твърдение, че изпитването е проведено в съответствие с критериите за качество, посочени по-горе,
- проведеното изпитване (изпитване за определяне на диапазон и/или дефинитивно изпитване),
- точно описание на експерименталните условия или твърдение, че изпитването е проведено в съответствие с метода, като всички отклонения трябва да бъдат съобщени,
- точно описание на начина, по който изпитваното вещество е смесено в основния експериментален субстрат,
- информация за експерименталните организми (вид, възраст, средна стойност и диапазон на теглото, условия на отглеждане и размножаване, доставчик),

▼B

- метод, използван за определяне на LC₅₀,
- резултати от изпитването, включително всички използвани данни,
- описание на наблюдаваните симптоми или на измененията в поведението на експерименталните организми,
- смъртност при контролите,
- LC₅₀ или най-високата изпитвана концентрация без смъртност и най-ниската изпитвана концентрация със смъртност 100 %, 14 дни (и, по желание, седем дни) след началото на изпитването,
- построяване на кривата концентрация/отговор,
- резултати, получени с веществото за сравнение, независимо дали във връзка с настоящото изпитване или от предишни задачи за контрол на качеството.

4.

ПРЕПРАТКИ

1. ОИСП, Париж, 1981, Test Guideline 207, Решение на Съвета C(81) 30 final.
2. Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, London, 331 pp.
3. Bouche, M. B., 1972, Lombriciens de France, Ecologie et Systematique, Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.
4. Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. J. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, p. 99.
5. Комисия на Европейските общности, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.
6. Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden“, in: Rudolph/Boje, Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.



Допълнение

Размножаване и отглеждане на червенте преди изпитването

За размножаване на животните, 30 до 50 възрастни червея се поставят в кутия за размножаване с пресен субстрат и се изваждат след 14 дни. Тези животни могат да се използват за получаване на допълнителни партиди за размножаване. Излопените от какавидите земни червеи се използват за изпитване, когато съзряят (след два до три месеца при предписаните условия).

Условия на отглеждане и размножаване

Климатична камера: температура 20 ± 2 °C, за предпочитане с непрекъснато осветяване (интензивност на светлината 400 до 800 лукса).

Кутии за размножаване: подходящи плитки контейнери с обем 10 до 20 l.

Субстрат: *Eisenia foetida* може да се отглежда в екскрементите на различни животни. Като среда за отглеждане се препоръчва да се използва смес в обем от 50 % торф и 50 % кравешка или конска тор. Средата трябва да има стойност на рН около 6 до 7 (регулирана с калциев карбонат) и ниска йонна проводимост (под 6 mmol или 0,5 % концентрация на сол).

Субстратът трябва да бъде влажен, но не прекалено мокър.

Освен посочения по-горе метод, могат успешно да се използват и други процедури.

Забележка: Съществуват две разновидности *Eisenia foetida*, които някои таксономи разделят като видове (Bouche, 1972). Те са морфологично сходни, но единият, *Eisenia foetida foetida*, обичайно има напречни черти или ленти върху сегментите, а при другия, *Eisenia foetida andrei*, това липсва, освен това той има пъстър червеникав цвят. Когато е възможно, трябва да се използва *Eisenia foetida andrei*. Ако съществува необходимата методика, могат да се използват други видове.



В.9. БИОЛОГИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ

ИЗПИТВАНЕ ПО ZAHN — WELLENS

1. МЕТОД

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Целта на метода е да оцени потенциалната крайна биологична разградимост на неразтворими във вода нелетливи органични вещества, когато са подложени на експозиция на относително високи концентрации на микроорганизми в условията на статично изпитване.

Възможно е да настъпи физико-химична адсорбция на суспендираните твърди вещества и това трябва да се вземе предвид при интерпретиране на резултатите (вижте 3.2).

Изпитваните вещества се използват в концентрации, съответстващи на стойностите на РОВ в диапазона 50 до 400 mg/l или стойностите на ХПК в диапазона 100 до 1 000 mg/l (РОВ = разтворен органичен въглерод; ХПК = химична потребност от кислород). Предимството на тези относително високи концентрации е аналитичната сигурност. Съединенията с токсични свойства могат да забавят или да потиснат процеса на разграждане.

При този метод измерването на концентрацията на разтворения органичен въглерод или на химичната потребност от кислород се използва за определяне на крайната биологична разградимост на изпитваното вещество.

Едновременното използване на специфичен аналитичен метод може да даде възможност за определяне на първичното биологично разграждане на веществото (изчезване на родителската химична структура).

Методът е приложим само за тези изпитвани органични вещества, които, при използваната за изпитването концентрация:

- са разтворими във вода при експерименталните условия,
- имат пренебрежимо ниско парно налягане при експерименталните условия,
- не потискат развитието на бактериите,
- се адсорбират в ограничена степен в рамките на експерименталната система,
- не се губят при образуване на пяна в експерименталния разтвор,

Информацията за относителните пропорции на основните компоненти на изпитвания материал ще бъдат полезни за интерпретиране на получените резултати, по-конкретно в случаите, когато резултатите са ниски или гранични.

За интерпретиране на ниските резултати и за избор на подходящи експериментални концентрации е желателно да има информация за токсичността на веществото за микроорганизмите.

▼ B

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ЕДИНИЦИ

Величината на разграждането, постигната в края на изпитването, се отчита като „Биологично разграждане при изпитване по Zahn — Wellens“:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{C_T - C_B}{C_A - C_{BA}} \right] \times 100$$

където:

D_T = биологично разграждане (%) във времето T ,

C_A = стойности на РОВ (или на ХПК) в експерименталната смес, измерени три часа след началото на изпитването (mg/l) (РОВ = разтворен органичен въглерод, ХПК = химична потребност от кислород),

C_T = стойности на РОВ (или на ХПК) в експерименталната смес по време на вземането на проби (mg/l),

C_B = стойности на РОВ (или на ХПК) в празната проба по време на вземането на проби (mg/l),

C_{BA} = стойности на РОВ или ХПК в празната проба, измерени три часа след началото на изпитването (mg/l).

Степента на разграждане се закръглява до най-близкия цял процент.

Процентното разграждане се представя като процент от отнемането на РОВ (или на ХПК) от изпитваното вещество.

Разликата между измерената стойност след три часа и изчислената или, за предпочитане, измерената първоначална стойност, може да даде полезна информация за елиминирането на веществото (вижте 3.2. Интерпретиране на резултатите).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

В някои случаи при изпитване на нови вещества, може да са полезни вещества за сравнение. Все още, обаче, не могат да бъдат препоръчани конкретни вещества за сравнение.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

В стъклен съд с обем от един до четири литра с бъркачка и аератор се поставят заедно активирана утайка, минерални хранителни вещества и изпитваният материал като единствен източник на въглерод във воден разтвор. Сместа се разбърква и аерира при температура 20 до 25 °C и дифузно осветление или в тъмна стая за период до 28 дни. Процесът на разграждане се мониторира за определяне стойностите на РОВ (или на ХПК) във филтриран разтвор ежедневно или през други подходящи равни интервали от време. Съотношението на елиминирания РОВ (или ХПК) след всеки интервал и стойността, получена три часа след началото, се изразява като процент на биологично разграждане и служи като мярка за степента на разграждане в този момент. Построява се крива на биологичното разграждане като резултатът се нанася на графика срещу времето.

Когато се използва специфичен аналитичен метод, могат да се измерят промените в концентрацията на родителската молекула поради биологично разграждане (първична биологична разградимост).

▼B

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

С помощта на кръгово изпитване е доказано, че възпроизводимостта на този метод е задоволителна.

Чувствителността на метода в голяма степен се определя от вариабилността на празната проба и, в по-малка степен, от точността на определянето на разтворения органичен въглерод и от нивото на изпитваното съединение в течността.

1.6. ОПИСАНИЕ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНАТА ПРОЦЕДУРА

1.6.1. *Подготовка*

1.6.1.1. Реактиви

Експериментална вода: питейна вода със съдържание на органичен въглерод < 5 mg/l. Общата концентрация на калциевите и магнезиевите йони не трябва да надвишава 2,7 mmol/l, в противен случай е необходимо адекватно разреждане с деионизирана или дестилирана вода.

Сярна киселина, аналитичен реактив: 50 g/l.

Разтвор на натриев хидроксид, аналитичен реактив: 40 g/l.

Разтвор на минерални хранителни вещества: разтворете в един литър деионизирана вода:

амониев хлорид, NH₄Cl, аналитичен реактив: 38,5 g,

натриев дихидрогенфосфат, NaH₂PO₄·2H₂O, аналитичен реактив: 33,4 g,

калиев дихидрогенфосфат, KH₂PO₄, аналитичен реактив: 8,5 g,

ди-калиев монохидрогенфосфат, K₂HPO₄, аналитичен реактив: 21,75 g.

Сместа служи както като хранително вещество, така и като буферна система.

1.6.1.2. Апаратура

Съглени съдове с обем един до четири литра (например цилиндрични съдове).

Бъркачка със стъклена или метална бъркалка, монтирана на подходящ вал (бъркаката трябва да се върти приблизително 5 до 10 cm над дъното на съда). Вместо това може да се използва магнитна бъркалка с прът, дълъг 7 до 10 cm.

Съглена тръбичка с вътрешен диаметър 2 до 4 mm за вкарване на въздух. Отворът на тръбичката трябва да се намира на около 1 cm над дъното на съда.

Центрофуга (около 3 550 g).

Уред за измерване на рН.

Уред за измерване на разтворения кислород.

Хартиени филтри

▼ B

Апарат за мембранно филтриране.

Мембранни филтри, размер на порите 0,45 µm. Мембранните филтри са подходящи, ако е сигурно, че те нито освобождават въглерод, нито абсорбират веществото по време на филтрирането.

Аналитично оборудване за определяне съдържанието на органичен въглерод и химичната потребност от кислород.

1.6.1.3. Приготвяне на проба за инокулиране

Активирана утайка от станция за биологично пречистване се промива с експериментална вода чрез (многократно) центрофугиране или утаяване (горе).

Активираната утайка трябва да бъде в подходящо състояние. Такава утайка може да се получи от правилно функционираща пречиствателна станция за отпадъчни води. За да се получат колкото е възможно повече различни видове или щамове бактерии, може да се предпочете да се смесят проби за инокулиране от различни източници (например различни пречиствателни станции, почвени екстракти, речни води и др.). Сместа трябва да се третира, както е описано по-горе.

За проверка на активността на активираната утайка, вижте „Контрол на функционирането“ по-долу.

1.6.1.4. Приготвяне на експериментални разтвори

Към експерименталния съд добавете 500 ml експериментална вода, 2,5 ml/l разтвор на минерални хранителни вещества и активирана утайка в количество, което съответства на 0,2 до 1,0 g/l сухо вещество в крайната смес. Добавете достатъчно изходен разтвор на изпитваното вещество, така че в крайната смес да се получи концентрация на РОВ 50 до 400 mg/l. Съответните стойности на химичната потребност от кислород са 100 до 1 000 mg/l. Добавете експериментална вода, за да получите общ обем един до четири литра. Избраният общ обем зависи от броя на пробите, които трябва да се вземат за всяко определяне на РОВ и ХПК, и от обемите, които са необходими за аналитичната процедура.

Обикновено обем от два литра се смята за задоволителен. Приготвя се и поне един контролен съд (празна проба), който се наблюдава паралелно с всяка експериментална серия. Той съдържа само активирана утайка и разтвор на минерални хранителни вещества, приготвен с експериментална вода до същия общ обем, както в експерименталните съдове.

1.6.2. Провеждане на изпитването

Експерименталните съдове се разбъркват с магнитни бъркачки или винтови пропелери при дифузно осветление или в тъмна стая при температура 20 до 25 °C. Аерирането се постига с помощта на състен въздух, пречистен с филтър от памучна вата и, ако е необходимо, бутилка за отмиване. Утайката не трябва да се утаява и кислородната концентрация не трябва да спада под 2 mg/l.

Стойността на рН трябва да се проверява на редовни интервали (например ежедневно) и ако е необходимо, да се коригира на рН 7 до 8.

▼B

Загубите от изпаряване се компенсират непосредствено преди всяко вземане на проба с дейонизирана или дестилирана вода в необходимите количества. Полезно е да се отбележи нивото на течността върху съда преди започване на изпитването. След всяко вземане на проби нивото се отбелязва отново (без аериране и разбъркване). Първите проби се вземат винаги три часа след започване на изпитването, за да се открие адеорбирането на изпитвания материал от активираната утайка.

Елиминирането на изпитвания материал се последва от определяне на РОВ и ХПК, което се извършва ежедневно или на други редовни интервали. Пробите от експерименталния съд и празната проба се филтрират през внимателно промит хартиен филтър. Първите 5 ml от филтрат на експерименталния разтвор се изхвърлят. Трудните за филтриране утайки могат да бъдат отстранени предварително чрез центрофугиране в продължение на 10 минути. Измерването на РОВ и ХПК се повтаря най-малко два пъти. Изпитването продължава до 28 дни.

Забележка: Пробите, които остават мътни, се филтрират през мембранни филтри. Мембранните филтри не трябва да освобождават или да адеорбират никакъв органичен материал.

Контрол на функционирането на активираната утайка

Паралелно с всяка експериментална серия трябва да се наблюдава съд, съдържащ познато вещество, за да се провери функционалният капацитет на активираната утайка. За тази цел е полезен диетиленгликолят.

Адаптиране

Ако анализите се провеждат на относително кратки интервали (например ежедневно), адаптирането може да бъде лесно разпознано по кривата на разграждане (вижте фигура 2). Следователно изпитването не трябва да започва непосредствено преди края на седмицата.

Ако адаптирането възникне в края на изпитването, изпитването може да бъде удължено до завършване на разграждането.

Забележка: Ако е необходимо по-широко познаване на поведението на адаптираната утайка, същата активирана утайка се подлага още един път на експозиция на същия изпитван материал в съответствие със следната процедура:

Изключете бъркачката и аератора и оставете активираната утайка да се утаи. Изтеглете над стояща течност, допълнете до два литра с експериментална вода, разбъркайте за 15 минути и оставете да се утаи отново. След като отново се изтегли надстояща течност, използвайте оставащата утайка, за да повторите изпитването със същия материал в съответствие с 1.6.1.4 и 1.6.2 по-горе. Активираната утайка може да бъде изолирана и чрез центрофугиране вместо утаяване.

Адаптираната утайка може да бъде смесена с прясна утайка до концентрация 0,2 до 1 g/l сухо тегло.

▼B**Аналитични средства**

Нормално пробите се филтрират през внимателно измит хартиен филтър (за измиване използвайте дейонизирана вода).

Пробите, които остават мътни, се филтрират през мембранни филтри (0,45 µm).

Определянето на концентрацията на РОВ се повтаря два пъти в проби от филтратите (първите 5 ml се изхвърлят) с помощта на уред за определяне на общия органичен въглерод (общия окислям въглерод). Ако филтратът не може да бъде анализиран същия ден, той трябва да се съхранява в хладилник до следващия ден. Не се препоръчва по-продължително съхранение.

Концентрацията на ХПК се определя в проби от филтратите с аналитична апаратура за определяне на ХКП по процедурата, описана в позоваване 2 по-долу.

2. ДАННИ И ОЦЕНКА

Определянето на концентрациите на РОВ и ХПК в пробите се повтаря поне два пъти в съответствие с 1.6.2 по-горе. Разграждането в момента Т се изчислява по формула (с определения), дадена в 1.2 по-горе.

Степента на разграждане се закръглява до най-близкия цял процент. Величината на разграждането, постигната в края на изпитването, се отчита като „Биологично разграждане при изпитване по Zahn — Wellens“.

Забележка: Ако се постигне пълно разграждане преди изтичане на експерименталното време и този резултат се потвърди чрез втори анализ на следващия ден, изпитването може да бъде приключено.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Ако е възможно, протоколът от изпитването съдържа следното:

- първоначалната концентрация на веществото,
- цялата друга информация и експерименталните резултати, отнасящи се до веществото за сравнение, ако е използвано, и до празната проба,
- концентрацията след три часа,
- кривата на биологично разграждане с описание,
- датата и мястото, където са взети проби от експерименталните организми, състоянието на адаптиране, използваната концентрация и др.,
- научните мотиви за всички изменения в експерименталната процедура.

3.2. ИНТЕРПРЕТИРАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Отнемането на РОВ (ХПК), което постепенно настъпва в продължение на дни или седмици, показва, че изпитваното вещество се разгражда биологично.

▼B

В някои случаи, обаче, физико-химичната адсорбция може да играе роля, и това се демонстрира с присъствието на пълно или частично отнемане в началото, в рамките на първите три часа, а разликата между контролната и експерименталната надстояща течност остава на неочаквано по-ниско ниво.

Ако трябва да се направи разграничаване между биологичното разграждане (или частично разграждане) и адсорбцията, са необходими допълнителни изпитвания.

Това може да се направи по много начини, но най-убедително е използването на надстояща течност или утайка като проба за инокулиране в основно изпитване (за предпочитане респирометричен тест).

Изпитваните вещества, при които се наблюдава голямо неадсорбтивно отнемане на РОВ (ХПК) при това изпитване, трябва да се считат за потенциално биологично разградими. Частичното неадсорбтивно отнемане показва, че химическото вещество е подложено поне на известно биологично разграждане. Ниското или близкото до нула отнемане на РОВ (ХПК) може да се дължи на потискане на микроорганизмите от изпитваното вещество и това може да се докаже и чрез лизиране или загуба на утайка, водещи до образуване на мътна надстояща течност. Изпитването трябва да бъде повторено, като се използва по-ниска концентрация на изпитваното вещество.

Използването на специфичен за съединението аналитичен метод или маркирано с ^{14}C -изпитвано вещество могат да позволят по-висока чувствителност. При изпитвано съединение, маркирано с ^{14}C , възстановяването на $^{14}\text{CO}_2$ ще потвърди, че е настъпило биологично разграждане.

Когато резултатите са представени по отношение на първичното биологично разграждане, ако е възможно, трябва да бъде дадено обяснение за изменението в химичната структура, което води до загуба на отговор при родителското изпитвано вещество.

Валидирането на аналитичния метод трябва да бъде представено заедно с отговора, получен при празната експериментална среда.

4.

ПРЕПРАТКИ

- (1) ОИСП, Париж, 1981, Test Guideline 302 B, Решение на Съвета C(81) 30 final.
- (2) Приложение V В.9 Разграждане: Химична потребност от кислород, Директива 84/449/ЕИО на Комисията, *Официален вестник на Европейските общности* L 251, 19.9.1984 г.



Допълнение

ПРИМЕР ЗА ОЦЕНКА

Органично съединение:	4-етоксибензоева киселина
Теоретична експериментална концентрация:	600 mg/l
Теоретичен РОВ:	390 mg/l
Проба за инокулиране	Пречиствателна станция за отпадъчни води в ...
Концентрация	1 грам сух материал/литър
Състояние на адаптиране:	неадаптиран
Анализ:	определяне на РОВ
Количество на пробата:	3 ml
Контролно вещество:	диетиленгликол
Токсичност на съединението:	Няма токсични ефекти под 1 000 mg/l Използвано изпитване: Изпитване с ферментационни епруветки

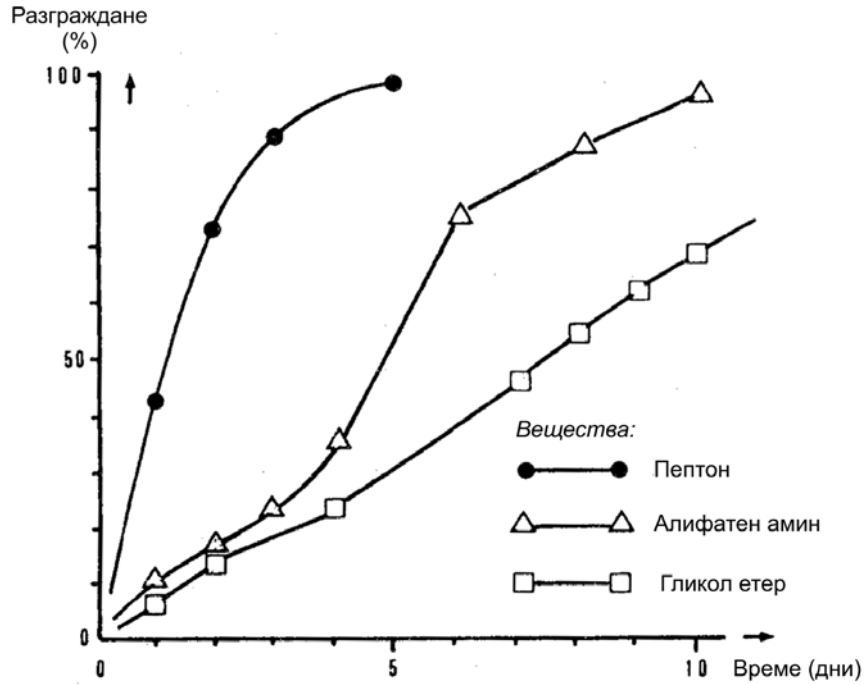
Време на изпитването	Контролно вещество:				Изпитвано вещество		
	Празна проба за РОВ ⁽¹⁾ mg/l	РОВ ⁽¹⁾ mg/l	Нетна стойност на РОВ mg/l	Разграждане %	РОВ ⁽¹⁾ mg/l	Нетна стойност на РОВ mg/l	Разграждане %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 часа	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 ден	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 дни	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 дни	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 дни	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 дни	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 дни	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 дни	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 дни	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

⁽¹⁾ Средни стойности от трикратно отчитане.

▼В

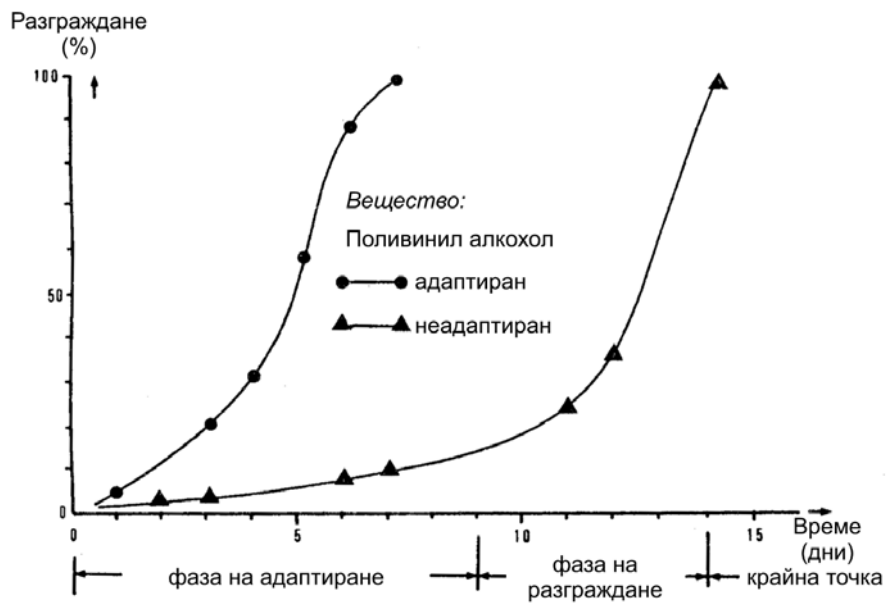
Фигура 1

Примери за криви на биологично разградимост



Фигура 2

Примери за адаптиране на утайка



▼ M4**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 утаител, от който утаената утайка се изпомпва обратно в резервоар за аериране, докато други не са оборудвани с утаител (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 елиминирани 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,

▼ **M4**

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 пълнят 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 CO₂ 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.

▼ M4

10. В често вземани проби от изходящите води на модула, в който е въведен изпитваният 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 различи 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 изпитваният 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).

▼M4**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 адипиновата 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 по-трудно 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 Hutmpp (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 утайтел) с вместимост около 1,5 литра; обемите могат да се променят до известна степен чрез коригиране на височината на утайтеля. 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 непронусклива пластмаса. Подходящ материал за порестия съд е порест полиетилен с максимален размер на порите 90 µm и дебелина 2 mm. Отделянето на утайката от третиранията органична среда се осъществява чрез диференциално премиване 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

▼ **M4**

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 наксне 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 µm), 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 m/s².

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,
 - амониев 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 ОИРС. 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 ± 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 периодично се използват смеси, стойността на DOC (или ХПК) на сместа трябва да се поддържа приблизително постоянна, например чрез разреждане с вода.

▼ **M4***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 прясно 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 намаляла 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.

▼ **M4**

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 сглобяват 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 утаителят 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.

▼ **M4***Дозиране 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 спомога 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, полегнала по стените на съда за аериране и утаителя, 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 утаителя 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 FeCl₃ с концентрация 50 g/l), но трябва да се удостовери, че добавянето на FeCl₃ не води до реакция или утаяване на изпитвания химикал,

▼ **M4**

- 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 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ до $25 \text{ }^\circ\text{C}$). 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 mg N произвежда еквивалента на около 7 mg CO_3^- . 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 запазват контролните съдове и съдовете за провеждане на изпитването. С помощта на специфичен анализ се измерва концентрацията на изпитвания химикал в изпитваните входящи води или тя 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 събирани 24 часа) и се филтруват през мембранен филтър с размер на порите $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ 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 филтруване. 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 биоизграждане.
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 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.

▼ **M4**

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 амониеви 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 °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 (напр. 10 ml/l разтвор на сярна киселина с концентрация 400 g/l) или чрез добавяне на подходящо токсично вещество (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.

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

▼ **M4**

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_{ic} на изпитвания химикал, определените дневни стойности на елиминирането (D_t , точка 52) трябва да се коригират с помощта на уравнението:

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

Изразяване на резултатите от изпитването

56. Нанасят се графично стойностите на процента на елиминиране D_t (или D_{ic}) 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.

▼ M4*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 инокулума 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.

▼ **M4**

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 mg/l азот от амоняк и < 2 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—20 mg/l; метод на добавяне; дата на първото добавяне; промени,
- средна възраст на утайката и средно време на задържане 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, обемен 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.

▼ **M4***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. Umwelchem. 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.

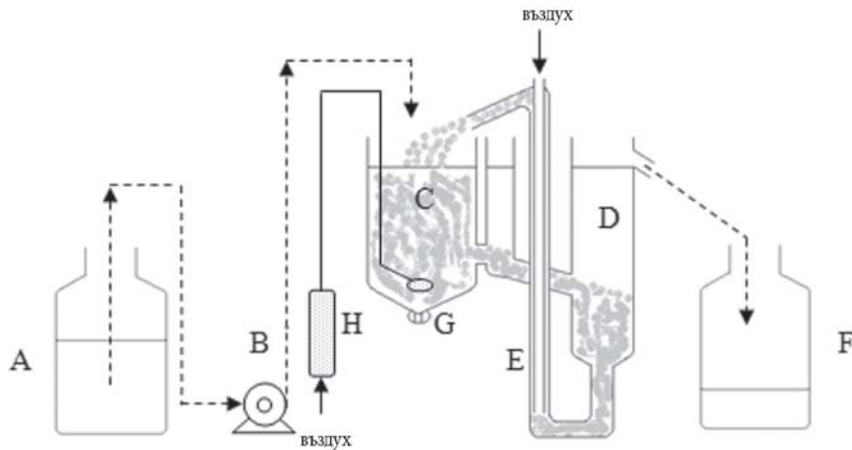
▼ **M4**

Допълнение 1

Фигура 1

Оборудване, използвано за оценка на биоразградимостта

Модул на Husmann

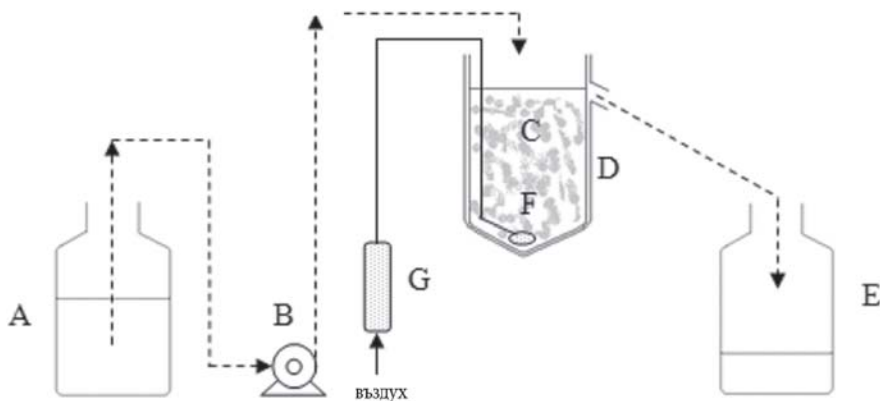


- | | | | |
|---|-------------------------------------|---|-------------------------|
| A | Съд за съхранение | E | Въздушна (ерлифт) помпа |
| B | Дозираща помпа | F | Съд за събиране |
| C | Камера за аериране (с капацитет 3l) | G | Аератор |
| D | Утаител | H | Дебитомер за въздух |

Фигура 2

Оборудване, използвано за оценка на биологичната разградимост

Порест съд

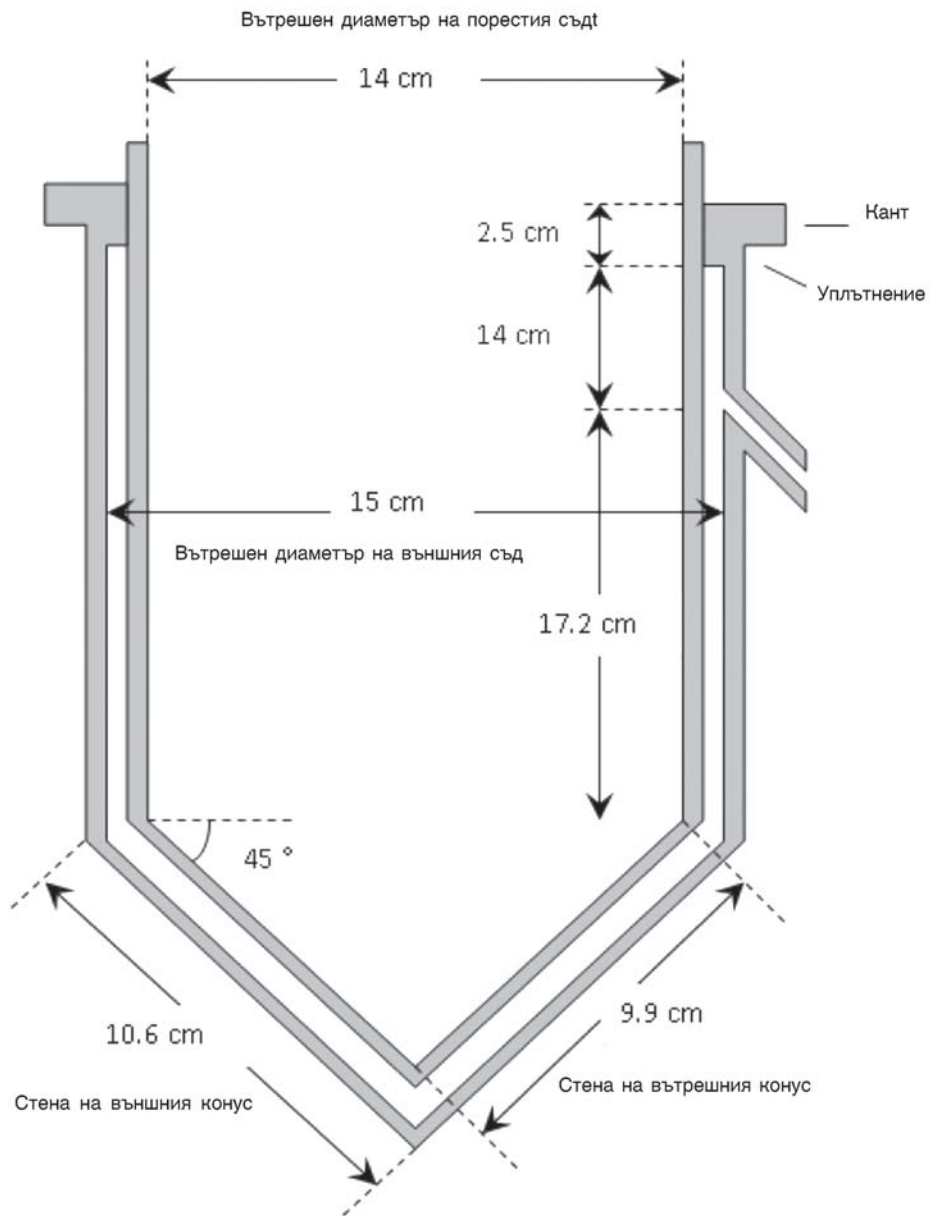


- | | | | |
|----|-------------------------|---|---------------------|
| A. | Съд за съхранение | E | Съд за събиране |
| B. | Дозираща помпа | F | Дифузор |
| C. | Порест съд за аериране | H | Дебитомер за въздух |
| D. | Външен непропусклив съд | | |

▼ M4

Фигура 3

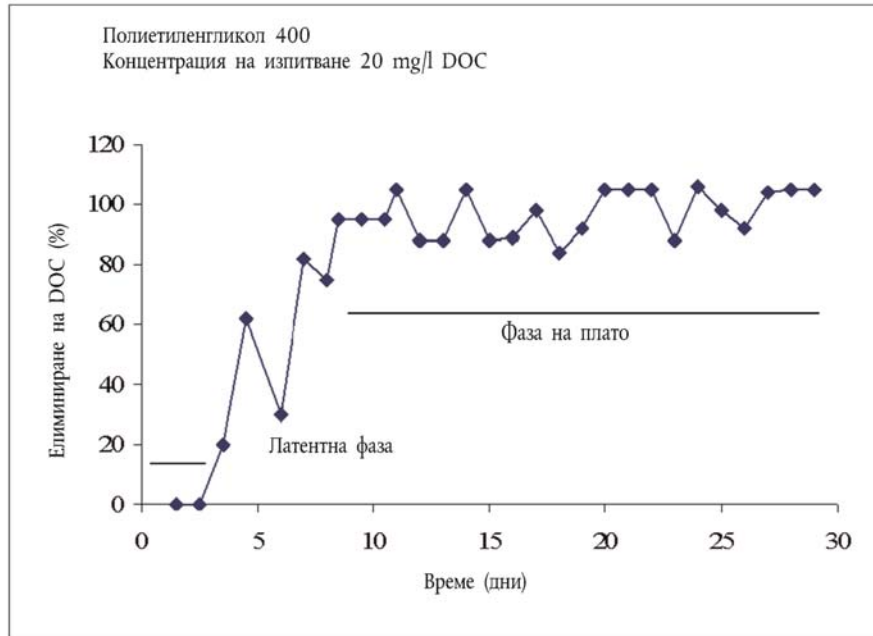
Подробности за трилитровия съд за аериране с порест съд



▼ M4

Допълнение 2

Пример на крива на елиминиране



▼ M4*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.

▼ **M4***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 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_0 на БПК, DOC, ХПК и т.н. за изпитвателния и за контролния модул може да се изчисли с помощта на уравнението:

$$R_0 = 100 (I - E)/I \%$$

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.

▼M4

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.

▼ **M4***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 стабилизирани 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 B.4 от настоящото приложение (5) B, E или G), 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.

▼ **M4**

Изчисление:

- а) При небιологично 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 небιологичните (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

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

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

$S_V = 22,5 \text{ mg/l}$

$S_E = 50 \text{ } \mu\text{g/l}$

▼ M4

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).

▼ M4

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, произведени 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 θ_s), 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.

▼ **M4**

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 (± 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 периодически 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

▼ **M4**

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 елиминирани, 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 °С. 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 появят 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.

▼ **M4****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 , μ_m и θ_{SC} — критичното време на задържане на утайката.

(Като алтернатива, приблизителните стойности на K_S и μ_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 μ_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. такива 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 по-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.

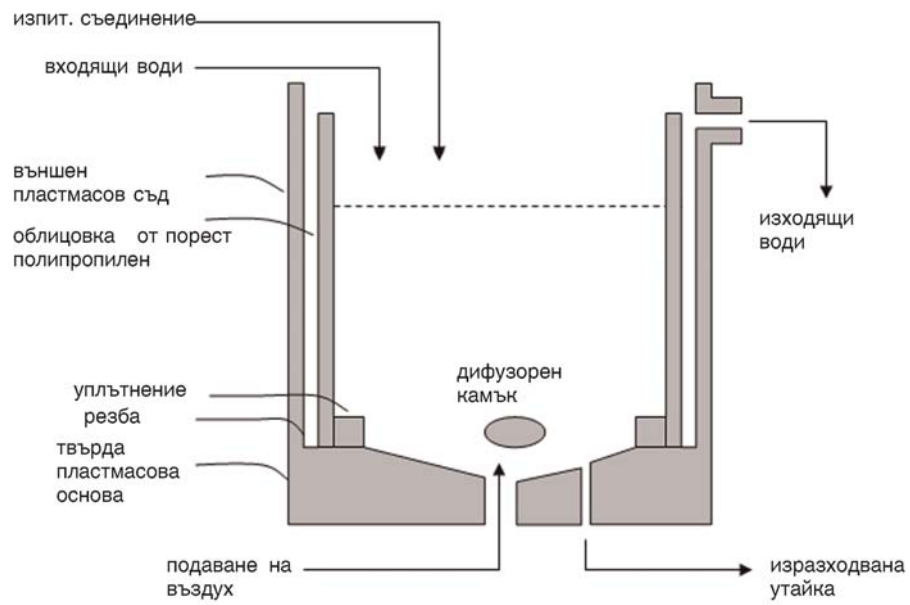
▼ **M4**

- (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.

▼ M4

Допълнение 6.1

Порест съд с контрол на ВЗК



▼ **M4***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:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \quad [1]$$

или

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \quad [2]$$

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)

μ = специфична скорост на растеж (d^{-1})

μ_m = максимална стойност на μ_m (d^{-1})

K_d = специфична скорост на разграждане на активните твърди вещества (d^{-1})

θ_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 θ_s .
- iii) За дадена концентрация S_0 на входящите води има критично време на задържане на утайката, такова че:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad [3]$$

където

θ_{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 тегловния 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

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \quad [4]$$

▼ M4

и

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

където

V = обем на съда за аериране (l)

X₁ = концентрация на твърди вещества в съда за аериране (mg/l).X₂ = концентрация на твърди вещества в изходящите води (mg/l)Q₀ = дебит на входящите води (l/d)Q₁ = 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 Q₁.

Заключения

- 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 S₁ в зависимост от θ_s, в редица случаи може бързо да се оцени критичното време на задържане на утайката θ_{SC}, напр. крива 3 на фигура 1. Когато това не е възможно, θ_{SC} може да се изчисли, както и приблизителните стойности на μ_m и K_s, като се нанесат стойностите на S₁, в зависимост от S₁•θ_s.

Новата формулировка на уравнение [1] дава:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [5]$$

Ако K_d е малко, 1 + θ_s • K_d ~ 1 и [5] приема вида:

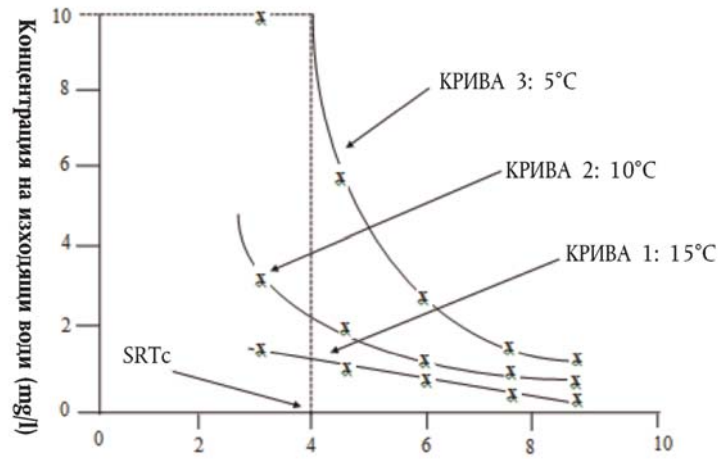
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [6]$$

По този начин графиката трябва да е права линия (вж. фигура 2) с наклон 1/μ_m и да пресича K_s/μ_m; а също θ_s ~ 1/μ_m.

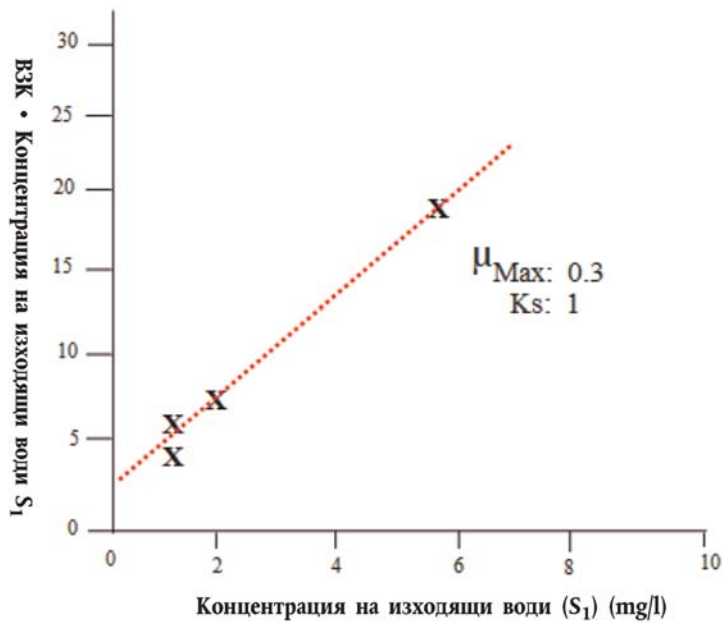
▼ M4

Фигура 1

Три температури; пет ВЗК



Фигура 2

Регресионна линия на ВЗК • S₁ по отношение на S₁ при T = 5 °C

Речник:

Концентрация на изходящи води:

Крива:

▼ **M4***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}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}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 утайчестост на утайката) чрез добавяне на фосфат в качеството на буфер, екстракт от мая, железен(III) хлорид и соли на микроелементи, а техният DOC е увеличен на около 750 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 (изходящите 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

▼ **M4**

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—50 µg/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):

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g h)$$

където

t = време на аериране (23 часа)

C_e = концентрация в края на аерирането (µg/l)

C_i = концентрация в началото на аерирането (µg/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—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-задълбочено, 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.

▼ M4

- (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 $\mu\text{g/l}$ 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 ($\mu\text{g/l}$ range) and standard (ppm range) chemical concentrations. *Chemosphere* 33 (4): 711-735.
- (6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, № 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. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼ M4

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 произвеждани 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 захранват 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 CO₂ 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 CO₂ 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. Условиата на работа на реактора се избират така че да осигуряват адекватно елиминиране на органичните вещества, и, ако това се изисква, окисляване на амониевия йон.

▼ M4

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 В.10-А). 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 В.10-А) 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 повърхностноактивни 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 пораждаат. 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).

▼ **M4****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 издатина 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 бавно-въртящ 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 CO₂ може да бъде събиран 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 μm), 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 m/sec².
19. Аналитично оборудване за определяне на:
 - DOC/общ органичен въглерод (TOC), 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.

▼ **M4***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 ОИСП. 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, (KH_2PO_4), 28 mg; натриев хлорид, (NaCl), 7 mg; калциев 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 ОИСП 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-близо 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 угаени отпадъчни води, събирани ежедневно от пречиствателни станции, приемачи предимно битови отпадъчни води. Те трябва да са събрани от преливника на първия утаител 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 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, 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

▼ M4

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 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 с малки количества неорганична киселина или основа се неутрализира стандартният разтвор до получаване на рН, 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 сглобяват в помещение с постоянна температура, обикновено равна на 22 ± 2 °C.
32. Перисталтичната помпа се регулира да подава 250 ± 25 ml/h органична среда (без изпитван химикал) в наклонените тръби, които се въртят със скорост 18 ± 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.

▼ **M4***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 филтрат през мембрани или се центрофугират при около 40 000 m/sec² за около 15 min (точка 18). Може да се окаже необходимо пробите да се оставят да се утаят или да се филтрат 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 подготовянето 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 изпитваният 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.

▼ **M4***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 обхваща 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)

▼ M4

Ако аналитичният метод дава положителна стойност при неизменени отпадъчни води, която е еквивалентна на S_c mg/l, процентът на елиминиране (D_{SC}) се изчислява по следната формула:

$$DSC = 100 (S_i - S_e + S_c) / (S_i + S_c) \%$$

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 адсорбирания 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.

▼ **M4****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 CO₂ (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,

▼ **M4**

- 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:

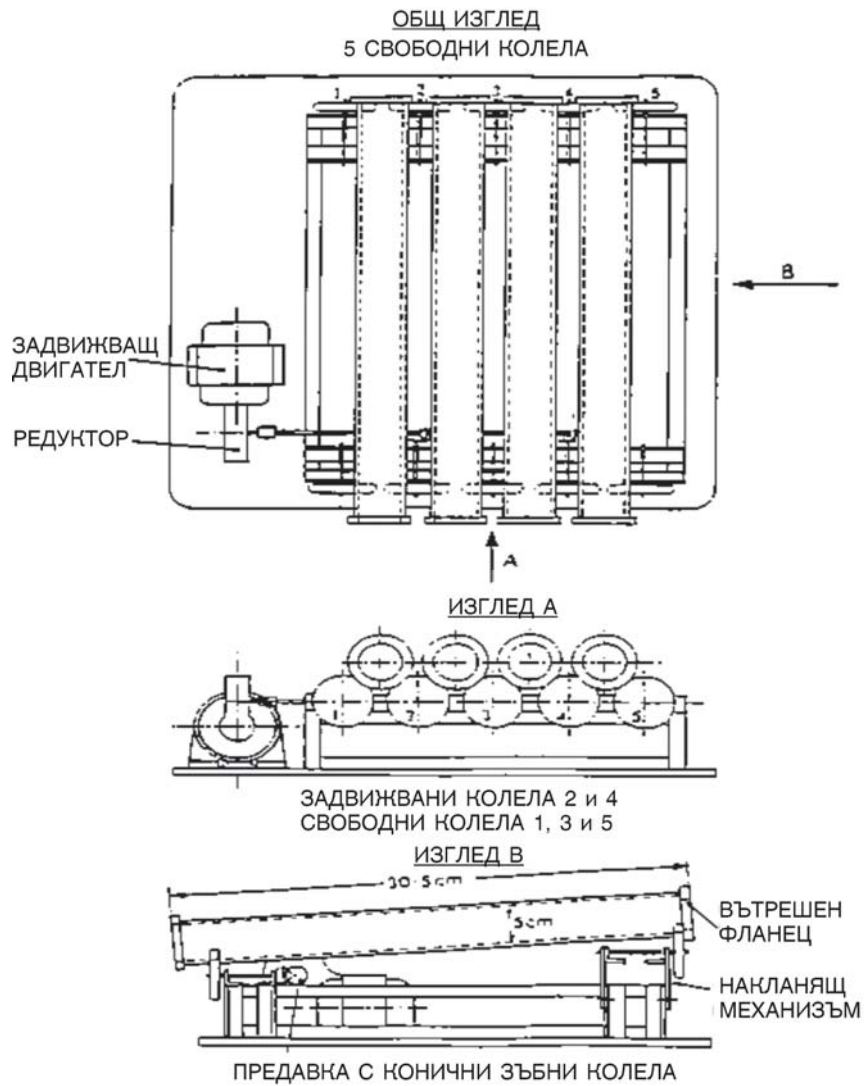
- (1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. *Wat. Res.* 14: 753-758.
- (2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically 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.

▼ M4

Допълнение 8

Фигура 1

Въртящи се тръби

*Речник:*

Общ изглед:

Изглед А/В:

Задвижвани колела:

Свободни колела:

Задвижващ двигател:

Редуктор:

Вътрешен фланец:

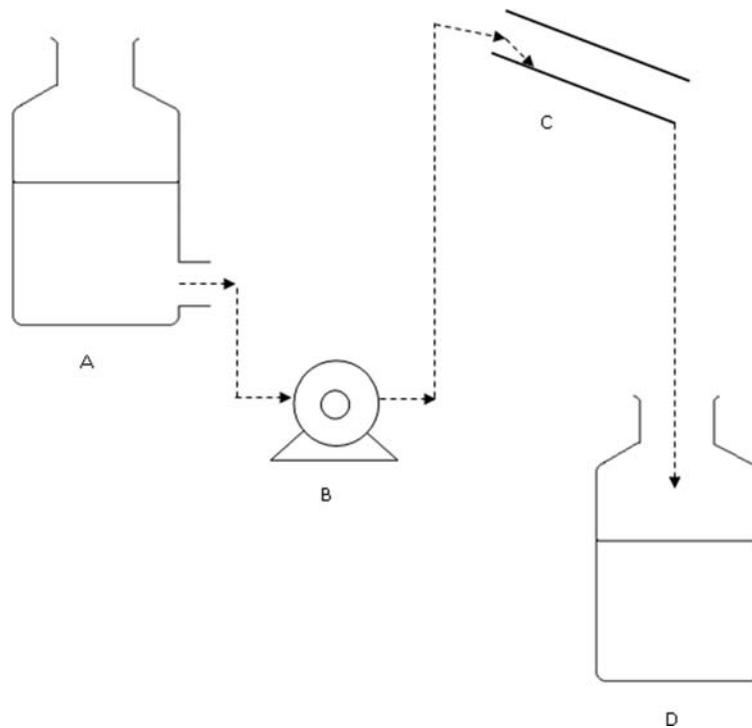
Наклонящ механизъм:

Предавка с конични зъбни колела:

▼ M4

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“.

▼ M6

B.11. ИЗПИТВАНЕ ЗА ПОТИСКАНЕ ДИШАНЕТО НА АКТИВНА УТАЙКА (ОКИСЛЯВАНЕ НА ВЪГЛЕРОД И АМОНИЕВИ ЙОНИ)

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 209 (2010). Настоящият метод за изпитване описва начин за определяне на въздействието на даден химикал върху микроорганизми от активна утайка (предимно бактерии) чрез измерване на тяхната скорост на дишане (оxygenation на въглерод и/или амониеви йони) при определени условия в присъствие на различни концентрации на изпитвания химикал. Този метод за изпитване се базира на изпитването на ETAD (Асоциация в областта на екологията и токсикологията на отрасъла за производство на багрила) (1) (2), на предходните насоки на ОИСП TG 209 (3), както и на преработения стандарт ISO 8192 (4). Целта на това изпитване е да се осигури метод за бърз скрининг за оценка на въздействията от химикали върху микроорганизмите в активната утайка от биологичната (аеробна) фаза в пречиствателни станции за отпадъчни води. Резултатите от изпитването могат да служат също като показател за подходящи непотискащи концентрации на изпитваните химикали, които да се използват при изпитвания за биоразградимост (например глави B.4 A—E, B.9, B.10, B.12 и B.29 от настоящото приложение, ОИСП TG 302C). В този случай изпитването може да се проведе като скринингов тест, сходен с изпитванията за определяне на обхвата дефинитивното или с граничните изпитвания (вж. точка 39), като се има предвид само общото дишане. Тази информация обаче следва да се приема с необходимото внимание за изпитванията за пълна биоразградимост (глави B.4 A—E и B.29 от настоящото приложение), за които концентрацията на инокулума е значително по-ниска от използваната в настоящия метод за изпитване. Същност в резултат от липсата на потискане в настоящото изпитване на дишането не се стига автоматично до условия на липса на потискане в изпитванията за пълна биоразградимост от глави B.4 A—E или B.29 от настоящото приложение.
2. Изпитването за потискане на дишането като цяло изглежда е прилагано успешно, откато е публикувано за първи път, но в някои случаи са протоколирани недостовърни резултати, напр. (2) (4) (5). Кривите на връзката между концентрацията и дишането понякога са двуфазни, графиките на зависимостта доза-отклик са били изкривени и стойностите на EC₅₀ са били неочаквано ниски (5). Чрез проучвания беше показано, че тези резултати са получени, когато използваната при изпитването активна утайка претърпява значителна нитрификация и изпитваният химикал оказва по-голямо въздействие върху окисляването на амониевите йони, отколкото върху общото хетеротрофно окисляване. Следователно тези недостовърни резултати могат да бъдат избегнати чрез провеждането на допълнително изпитване, като се използва специален инхибитор на нитрификацията. Чрез измерване на скоростта на усвояване на кислорода при наличие и в отсъствие на такъв инхибитор, напр. *N*-алилтиуреа (ATU), могат да бъдат изчислени поотделно общата скорост на усвояване на кислород и скоростта на усвояване на кислород при хетеротрофното окисление и при нитрификацията (4) (7) (8). Така може по обичайния начин да бъде определено потискащото въздействие на изпитвания химикал върху двата процеса и да се изчислят стойностите на EC₅₀ както за окисляването на органичния въглерод (хетеротрофно окисляване), така и за окисляването на амониевите йони (нитрификацията). Следва да се отбележи, че в някои редки случаи потискащият ефект на *N*-алилтиуреа може да бъде частично или напълно премахнат в резултат на образуване на комплексни съединения с изпитвани химикали или добавки в средата, например Cu⁺⁺ йони (6). Cu⁺⁺ йоните са от съществено значение за *Nitrosomonas*, но са токсични в по-висока концентрация.
3. Необходимостта от нитрификация в аеробното пречистване на отпадъчни води, като необходима стъпка в процеса на отстраняването на азотните съединения от отпадъчните води посредством денитрификация чрез газообразни продукти, е спешно необходима, особено в европейските страни; Понастоящем ЕС е определил по-ниски гранични стойности на концентрацията на азот в пречистените отпадъчни води, зауствани в приемниците (1).

(1) Директива 91/271/ЕИО на Съвета от 21 май 1991 г. относно пречистването на отпадъчните води от населените места. ОВ L 135, 30.5.1991 г., стр. 40.

▼ M6

4. За повечето цели методът за оценка на въздействието върху процесите на окисляване на органичен въглерод сам по себе си е достатъчен. Въпреки това, в някои случаи изследването на въздействието само върху нитрификацията, или поотделно както върху нитрификацията, така и върху и органичния въглерод, е необходимо за тълкуването на резултатите и за разбирането на въздействията.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

5. Скоростта на дишане на проби от активна утайка, запазена със синтетични отпадъчни води, се измерва в затворена камера, съдържаща кислороден електрод след време за контакт от 3 часа. При разглеждане на реалистичния сценарий на експозиция може да бъде подходящо по-продължително време за контакт. Ако изпитваният химикал се разгражда бързо, например абиотично чрез хидролиза, или ако е летлив и концентрацията не може да се поддържа по адекватен начин, може да се използва в допълнение по-кратък период на експозиция, например 30 минути. Чувствителността на всяка партида активна утайка трябва да се проверява с подходящ референтен химикал в деня на експозицията. Изпитването обикновено се използва за определяне на EC_x (например EC_{50}) на изпитвания химикал и/или за концентрацията без наблюдавано въздействие (NOEC).
6. Потискането на усвояването на кислород от микроорганизмите, окисляващи органичен въглерод, може да бъде изразено отделно от това на микроорганизмите, окисляващи амониеви йони, чрез измерване на усвояването на кислород в отсъствие и при наличие на *N*-алилтиоуреа, специфичен инхибитор на окисляването на амониевия йон до нитрит от нитрифициращите бактерии от първата фаза. В този случай процентът на потискане на скоростта на усвояване на кислород се изчислява чрез сравняване на скоростта на усвояване на кислород в присъствието на изпитван химикал със средната скорост на усвояване на кислород на съответните контроли, които не съдържат изпитван химикал, както в присъствие, така и при отсъствие на специфичния инхибитор, *N*-алилтиоуреа.
7. Всяко усвояване на кислород, произтичащо от абиотични процеси, може да бъде открито чрез определяне на скоростта в смеси от изпитван химикал, среда от синтетични отпадъчни води и вода, без активна утайка.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНИЯ ХИМИКАЛ

8. Необходимо е да са известни идентичността (за предпочитане CAS номерът), наименованието (по IUPAC), чистотата, водоразтворимостта, парното налягане, летливостта и адсорбционните характеристики на изпитвания химикал, за да е възможно да се извърши правилно тълкуване на резултатите. По принцип летливите химикали не могат да бъдат адекватно изпитвани, освен ако не са взети специални предпазни мерки (вж. точка 21).

ПРИЛОЖИМОСТ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

9. Методът за изпитване може да се прилага за разтворими във вода, малко разтворими и летливи химикали. Не винаги обаче е възможно да се получат стойности на EC_{50} при химикали с ограничена разтворимост, а валидни резултати при летливи химикали могат да бъдат получени само при условие че по-голямата част (например > 80 %) от изпитвания химикал остава в реакционната смес в края на периода(ите) на експозиция. Допълнителни подкрепящи аналитични данни следва да бъдат представени за по-точно определяне на концентрацията за EC_x , когато съществува каквато и да е несигурност по отношение на стабилността или летливостта на изпитвания химикал.

▼ **M6****РЕФЕРЕНТНИ ХИМИКАЛИ**

10. Референтните химикали следва да се изпитват периодично, за да се гарантира, че методът за изпитване и условията на изпитване са надеждни, и за да се провери чувствителността на всяка партида активна утайка, използвана като микробен инокулум в деня на експозицията. Химикалът 3,5-дихлорофенол (3,5-DCP) се препоръчва като референтен инхибиращ химикал, тъй като е познат инхибитор на дишането и се използва в много видове изпитвания за потискане/токсичност (4). Също така като референтен химикал за потискане на общо дишане може да се използва меден(II) сулфат пентахидрат (9). Като специфичен референтен инхибитор на нитрификацията може да бъде използван *N*-метиланилин (4).

КРИТЕРИИ ЗА ВАЛИДНОСТ И ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ

11. Стойността на скоростта на усвояване на кислород при празните контролни проби (без изпитван химикал или референтен химикал) следва да бъде не по-малко от 20 mg кислород на един грам активна утайка (сухо тегло на суспендираните твърди вещества) за един час. Ако скоростта е по-ниска, изпитването трябва да се повтори с промита активна утайка или с утайка от друг източник. Коефициентът на вариация на скоростта на усвояване на кислород в контролните повторения не трябва да бъде повече от 30 % в края на окончателното изпитване.
12. През 2004 г. в международно кръгово изпитване, организирано от ISO (4), с използване на активна утайка, получена от битови отпадъчни води, е било установено, че стойността на EC_{50} на 3,5-DCP е в диапазон от 2 mg/l до 25 mg/l за общото дишане, от 5 mg/l до 40 mg/l за хетеротрофното дишане и от 0,1 mg/l до 10 mg/l за дишането, дължащо се на нитрификация. Ако стойността на EC_{50} на 3,5-DCP не попада в очаквания диапазон, изпитването трябва да се повтори с активна утайка от друг източник. Стойността на EC_{50} на меден(II) сулфат пентахидрат трябва да се намира в диапазона 53 — 155 mg/l за общото дишане (9).

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ**Съдове и апаратура за изпитването**

13. Следва да се използва стандартно лабораторно оборудване, както и следното:
- Съдове за изпитване — например 1 000 ml бехерови чаши, съдържащи 500 ml реакционна смес (вж. 5 във фигура 1);
 - Камера и приспособления за измерване концентрацията на разтворен кислород; подходящ кислороден електрод; Затворена камера за съхранение на пробата без свободно пространство, и записващо устройство (напр. 7, 8, и 9 на фигура 1 от допълнение 2); като алтернатива може да се използва бутилка за БПК с подходяща адаптираща втулка за херметично прикрепяне на кислородния електрод към гърлото на бутилката (виж фигура 2 от допълнение 3). За да се избегне загубата на изместена течност при вкарването на кислородния електрод е препоръчително първо да се вкара фуния или стъклена тръбичка във втулката, или да се използват съдове със заоблена периферия. И в двата случая следва да бъдат използвани магнитна бъркалка или алтернативен метод за разбъркване, напр. саморазбъркващ се електрод;
 - магнитни бъркалки и магнитни пръчици за разбъркване, покрити с инертен материал, предназначени за използване в измервателна камера и/или в съдовете за изпитване;
 - устройство за аериране: ако е необходимо, сгъстен въздух следва да бъде пропуснат през подходящ филтър за отстраняване на прах и масло, и през съдържащи вода бутилки за отмиване за овлажняване на въздуха. Съдържанието на съдове трябва да се аерира с пипети

▼ **M6**

„Пастър“ или други устройства за аериране, които не адсорбират химикали. Въртяща се клатачна машина, работеща със скорост между 150 и 250 оборота в минута, с колби с примерна вместимост 2 000 ml, може да се използва за удовлетворяване на потребността от кислород за утайката и за преодоляване на трудностите, свързани с химикали, които произвеждат прекомерна пяна, които са летливи и следователно водят до загуби, или които са трудно диспергируеми при аериране чрез барботиране. Изпитвателната система обикновено се състои от поредица от бехерови чаши, аерирани непрекъснато, поставяни последователно една след друга (напр. на приблизително 10—15 минутни интервали) и след това анализирани последователно една след друга. Може да бъде използвана и утвърдена измервателна апаратура, която позволява едновременно и аериране, и измерване на скоростта на потребление на кислород в смесите;

д) рН-метър;

е) центрофуга, обикновена настолна центрофуга за утайки, с капацитет от 10 000 ml/s².

Реактиви

14. През цялото време се използват реактиви с квалификация „чист“.

Вода

15. Следва да се използва дестилирана или дейонизирана вода, със съдържание РОВ под 1 mg/l, освен в случаите, когато е посочена чешмяна вода без хлор.

Синтетични отпадъчни води

16. Средата трябва да бъде изготвена така, че да съдържа следните съставки в посочените количества:

— пептон	16 g
— месен екстракт (или сравним растителен екстракт)	11 g
— уреа	3 g
— натриев хлорид (NaCl)	0,7 g
— калциев хлорид дихидрат (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	0,4 g
— Магнезиев сулфат хептахидрат (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0,2 g
— безводен калиев монохидрогенфосфат (K ₂ HPO ₄)	2. 8 g
— дестилирана или дейонизирана вода до 1 литър	

17. Стойността на рН на разтвора следва да бъде 7,5 ± 0,5. Ако приготвената среда не се използва веднага, тя се съхранява на тъмно при температура от 0 °C до 4 °C не по-дълго от 1 седмица, или при условия, които не водят до промяна в нейния състав. Следва да се отбележи, че тази синтетична отпадъчна вода представлява 100-кратен концентрат на посочената в Техническия доклад на ОИСР от 11 юни 1976 г. „Предложение за метод за определяне на биоразградимост на повърхностноактивни вещества, използвани в синтетичните детергенти“, към който е добавен дикалиев хидрогенфосфат.

▼ M6

18. Като алтернатива, преди съхранението компоненти на средата могат да бъдат стерилизирани индивидуално, или пептонът и месният екстракт могат да бъдат добавени малко преди провеждането на изпитването. Преди употреба, средата трябва да бъде старателно разбъркана и рН следва да бъде коригирано, ако е необходимо, до $\text{pH } 7,5 \pm 0,5$.

Изпитван химикал

19. Изходен разтвор се приготвя за много разтворимите във вода изпитвани вещества до максималната им разтворимост във вода (не се допуска утаяване). Малко разтворимите във вода вещества, смесите с компоненти с различна разтворимост във вода и адсорбиращите се вещества следва пряко да се претеглят в съдовете за изпитване. В тези случаи използването на изходни разтвори може да бъде алтернатива, ако концентрациите на разтворените изпитвани химикали са аналитично определени в съдовете за изпитване (преди добавянето на активната утайка). Ако се изготвя водна фаза, съдържаща фракция от компоненти на смеси в разтвор, диспергирани или като емулсии (WAF), от съществено значение е и аналитичното определяне на концентрациите на разтворените изпитвани химикали в съдовете за изпитване. Използването на органични разтворители, диспергиращи добавки или емулгатори за подобряване на разтворимостта следва да се избягва. Ултрасонификацията на изходни разтвори и предварителното разбъркване на суспензии, напр. през нощта, е възможно, когато има подходяща налична информация относно стабилността на изпитвания химикал при такива условия.

20. Изпитваният химикал може да повлияе неблагоприятно върху рН в системата за изпитване. Стойността на рН на смесите, третирани с изпитвания химикал, следва да се определи при предварително изпитване преди опитната установка, за да се провери дали ще е необходима корекция на рН преди основното изпитване, и отново в деня на основното изпитване. Ако е необходимо, разтворите/суспензиите на изпитвания химикал във вода трябва да бъдат неутрализирани преди добавяне на инокулум. Обаче, тъй като при неутрализацията е възможно изменение на химичните свойства на химикала, могат да се извършат допълнителни изпитвания, в зависимост от целите на изследването, за да се оцени въздействието на изпитвания химикал върху утайката без коригиране на рН.

21. Токсичните ефекти на летливи химикали, особено при изпитвания, при които през системата преминава въздух чрез барботиране, могат да доведат до вариране в равнищата на въздействие, настъпващо вследствие на загубите на вещество по време на периода на експозиция. С такива вещества трябва да се действа предпазливо, чрез извършване на анализ, специфичен за веществата в контролните смеси, съдържащи веществото, и чрез изменение на режима на аериране.

Референтен химикал

22. Ако като референтен химикал се използва 3,5-дихлорофенол, следва да бъде изготвен разтвор на 1,00 g 3,5-дихлорофенол в 1 000 ml вода (15). Следва да се използва топла вода и/или ултрасонификация за ускоряване на разтварянето и за допълване на разтвора до пълния обем след охлаждането му до стайна температура. Следва обаче да се гарантира, че референтният химикал не е претърпял структурни промени. Стойността на рН на разтвора следва да бъде проверена и, ако е необходимо, коригирана до $\text{pH } 7 - 8$ с NaOH или H_2SO_4 .
23. Ако се използва меден(II) сулфат пентахидрат като референтен химикал, се използват концентрации от 58 mg/l, 100 mg/l и 180 mg/l (коефициент 1,8). Веществото се претегля директно в съдовете за изпитване (29 — 50 — 90 mg за 500 ml общ обем). След това то се разтваря с 234 ml автоклавирана чешмяна вода. Медният(II) сулфат пентахидрат е много разтворим. При започване на изпитването се добавят 16 ml синтетична отпадъчна вода и 250 ml активна утайка.

▼ **M6****Специфичен инхибитор на нитрификацията**

24. Следва да се изготви изходен разтвор от 2,32 g/l *N*-алилтиуреа (ATU). Добавянето на 2,5 ml от този изходен разтвор в инкубационна смес с окончателен обем от 500 ml води до получаването на крайна концентрация от 11,6 mg ATU/l (10^{-4} mol/l), за която е известно, че е достатъчна (4) да предизвика 100 % потискане на нитрификацията в нитрифицираща активна утайка, съдържаща 1,5 g/l суспендирани твърди вещества.

Абиотични контроли

25. При някои редки условия изпитван химикал, който е силен редутор, може да доведе до измерима абиотична консумация на кислород. В такива случаи са необходими абиотични контроли, за да се направи разграничаване между абиотично усвояване на кислород, причинено от изпитвания химикал, и микробното дишане. Абиотичните контроли могат да бъдат приготвени като не се поставя инокулум в изпитваните смеси. По подобен начин могат да бъдат включени абиотични контроли без инокулум, когато се извършват подкрепящи аналитични измервания за определяне на постигнатата концентрация по време на фазата на експозиция на изпитването, например когато се използват изходни разтвори на малко разтворими във вода химикали с компоненти с различна разтворимост във вода. В определени случаи може да е необходимо да се подготви абиотична контрола със стерилизиран инокулум (напр. чрез автоклавиране или добавяне на стерилизиращи токсични вещества). Някои химикали могат да доведат до реакция на освобождаване или свързване на кислород само ако съответната площ е достатъчно голяма за тази реакция, дори ако по принцип за тях е нужна много по-висока температура или налягане за такава реакция. В тази връзка специално внимание следва да се обърне на пероксидите. Стерилизиращият инокулум предоставя голяма площ.

Инокулум

26. За обща употреба активната утайка следва да бъде събрана на изхода от резервоара за аериране или близо до изхода от резервоара, в добре експлоатирана пречиствателна станция за отпадъчни води, получаваща предимно битови отпадъчни води. В зависимост от целта на изпитването, други подходящи видове или източници на активна утайка, например утайки, отглеждани в лабораторни условия, могат също така да бъдат използвани при подходящи концентрации на суспендирани твърди вещества от 2 g/l до 4 g/l. Съществува обаче вероятност утайките от различните пречиствателни станции да притежават различни характеристики и чувствителност.
27. Утайката може да се използва във вида, в който е събрана, но грубите частици трябва да бъдат отстранени чрез краткотрайно утаяване, например за 5 до 15 минути, и отливане на горния слой по-фини твърди частици, или пресяване (напр. с размер на отворите 1 mm²). Като алтернатива утайката може да бъде хомогенизирана с помощта на хомогенизатор за около 15 секунди или по-дълго, но е необходима предпазливост по отношение на силите на разкъсване и температурните промени, които могат да настъпят при периоди на хомогенизиране.
28. Често е необходимо измиване на утайката, напр. ако собствената скорост на дишането е ниска. Утайката следва първо да се центрофугира определен период от време за получаване на бистър супернатант и гранули от твърди вещества от утайката, например 10 минути при около 10 000 m/s². Супернатантната течност трябва да бъде изхвърлена, а утайката се ресуспендира в чешмяна вода без съдържание на хлор, с разклащане, след което се отстранява водата за отмиването чрез повторно центрофугиране и изхвърляне. Ако е необходимо, процесът на измиване и центрофугиране трябва да се повтори. Трябва да се определи сухата маса на предварително известен обем от ресуспендираната утайка и утайката следва да се концентрира чрез отстраняване на течност или да се разрежи допълнително в чешмяна вода без съдържание на хлор до получаване на необходимата концентрация от 3 g/l твърди вещества в утайката. Активната утайка трябва непрекъснато да се аерира (напр. 2 l/минута) при температурата на изпитването и по възможност да се

▼ M6

използва в деня на събирането. Ако това не е възможно, утайката трябва да се запазва ежедневно със синтетични отпадъчни води (50 ml синтетични отпадъчни води на един литър активна утайка) в продължение на два допълнителни дни. След това утайката се използва за целите на изпитването и резултатите се приемат за валидни, при условие че не е настъпила съществена промяна в нейната активност, оценена чрез нейните ендогенни скорости на хетеротрофно дишане и на дишане, дължащо се на нитрификация.

29. Могат да възникнат трудности, ако се образува пяна по време на инкубацията, доколкото пясната и поетите от нея твърди вещества от утайката се отстраняват от съдовете за аериране. В редки случаи образуването на пяна може просто да е резултат от наличието на синтетични отпадъчни води, но образуването на пяна трябва да се очаква, ако изпитваният химикал представлява повърхностноактивно средство или съдържа такова. Загубата на твърди вещества от утайката от изпитваните смеси води до изкуствено занижаване на скоростта на дишане, което може да бъде изтълкувано погрешно като резултат от инхибиране. В допълнение, аерирането на разтвор на повърхностноактивно средство концентрира повърхностноактивното средство в слоя от пяна; загубата на пяна в изпитвателната система понижава концентрациите на експозиция. Образуването на пяна може да бъде контролирано чрез прости механични методи (напр. спорадично ръчно разбъркване със стъклена пръчка) или чрез добавяне на силиконова антипенителна емулсия, която не съдържа повърхностноактивни средства, и/или чрез метод на аериране чрез разклащане в стъкленница. Ако проблемът е свързан с наличието на синтетични отпадъчни води, съставът на отпадъчните води следва да бъде изменен, като се включи реактив антипенител, например при 50 µl/l. Ако пясната се образува от изпитвания химикал, количеството, необходимо за намаляването, следва да се определя при максималната концентрация на изпитването, и след това всички отделни съдове за аериране следва да бъдат третирани по еднакъв начин (включително тези, в които отсъства пяна, като напр. празните контролни проби и референтните съдове). Ако се използват антипенители, те следва да не взаимодействат с инокуланта и/или изпитвания химикал.

ПРОЦЕДУРА НА ИЗПИТВАНЕ

30. Могат да бъдат определени три различни вида потискане на усвояването на кислород — общо, само хетеротрофно и дължащо се на нитрификация. Обикновено измерването на потискането на общото усвояване на кислород следва да е достатъчно. Въздействието върху хетеротрофното усвояване на кислород от окисляването на органичния въглерод и това, дължащо се на окисляването на амониевите йони, са необходими, когато съществува специално изискване за тези две отделни крайни точки за даден химикал, или (като вариант) за обясняване на нетипични криви доза-отклик, получени за общото усвояване на кислород.

Условия на изпитването

31. Изпитването трябва да се извършва при температура в диапазон 20 ± 2 °C.

Смеси за изпитване

32. Смесите за изпитване (F_T като в таблица 1), съдържащи вода, синтетични отпадъчни води и изпитвания химикал, следва да бъдат приготвени по такъв начин, че да се получат различни номинални концентрации на изпитвания химикал (вж. таблица 1 за пример с обеми на съставните части). Стойността на рН трябва да се коригира до $7,5 \pm 0,5$, ако е необходимо; смесите следва да се разреждат с вода и да се добави инокулумът за получаване на равни окончателни обеми в съдовете и за започване на аерирането.

Референтни смеси

33. Смесите (F_R) следва да се изготвят с референтния химикал, например 3,5-дихлорофенол, на мястото на изпитвания химикал, по същия начин, както и изпитваните смеси.

▼ M6**Празни контролни проби**

34. Празни контролни проби (F_B) следва да се изготвят в началото и в края на периода на експозиция при изпитвания, в които изпитвателните бехерови чаши се подават последователно на интервали. При изпитванията, извършвани с оборудване, което позволява едновременното измерване на потреблението на кислород, във всяка партида, подлагана на едновременен анализ, следва да бъдат включени най-малко две празни контролни проби. Празните контроли съдържат еднакъв обем активна утайка и синтетична среда, но не съдържат нито изпитван, нито референтен химикал. Те трябва да се разреждат с вода до същия обем като изпитваните и референтните смеси.

Абиотични контроли

35. Ако е необходимо, например ако за даден изпитван химикал се знае или се предполага, че е силен редуктор, трябва да се изготви смес F_A за измерване на абиотичното потребление на кислород. Сместа трябва да съдържа същите количества изпитван химикал и синтетични отпадъчни води и да е със същия обем като изпитваните смеси, но да е без активна утайка.

Обща процедура и измервания

36. Изпитваните и референтните смеси, и празните и абиотичните контроли се инкубират при температурата на изпитването в условията на принудително аериране (от 0,5 до 1 l/min), за да се запази концентрацията на разтворения кислород над 60-70 % насищане и парчетата утайка да се поддържат в суспензия. За да се поддържат в суспензия парчетата утайка е необходимо също така и разбъркване на културите. За започване на инкубацията се счита първоначалният контакт на инокулума от активна утайка с другите съставки на крайната смес. В края на инкубацията, след определените периоди на експозицията, обичайно равни на 3 часа, пробите се изваждат за измерване на скоростта на намаляване на концентрацията на разтворения кислород в камерата, предназначена за тази цел (фигура 2 от допълнение 3) или в изцяло запълнена бутилка за БПК. Начинът, по който започват инкубациите, зависи също така и от капацитета на оборудването, което се използва за измерване на скоростта на потреблението на кислород. Например, ако то включва само един кислороден електрод, измерванията се извършват индивидуално. В този случай следва да бъдат изготвени различните смеси, необходими за изпитването в синтетични отпадъчни води, но инокулумът следва да бъде задържан и необходимите части от утайката трябва да се добавят към всеки от поредицата съдове. Всяка инкубация трябва да бъде започната поотделно, на подходящо избрани интервали от време, например от 10 до 15 минути. Като алтернатива, измервателната система може да се състои от няколко електрода, които улесняват множество едновременни измервания; в този случай инокулумът може да се добави по едно и също време в съответните групи съдове.
37. Номиналната концентрация на активната утайка във всички изпитвани, контролни и празни проби със смеси (но не и в абиотичните контроли) е 1,5 g/l суспендирани твърди вещества. Потреблението на кислород следва да се измерва след 3-часова експозиция. Измервания с допълнителна 30-минутна експозиция следва да се извършат при необходимост и както е описано в параграф 5.

Потенциал за нитрификация при утайки

38. За да се реши дали утайката нитрифицира и, ако нитрифицира — с каква скорост, следва да бъдат изготвени смеси (F_B) като тази в празната контролна проба, и допълнителни „контролни“ смеси (F_N), но които съдържат също така и 11,6 mg/l *N*-алилтиуреа. Смесите

▼ **M6**

следва да се аерират и инкубират при 20 ± 2 °C за 3 часа. След това се измерват стойностите на скоростта на усвояване на кислород и се изчислява скоростта на усвояване на кислород, дължащо се на нитрификация.

ПЛАНИРАНЕ НА ИЗПИТВАНИЯТА*Изпитване за определяне на обхвата*

39. Когато е необходимо, се използва предварително изпитване, за да се оцени диапазонът на концентрациите на изпитвания химикал, необходим за окончателно изпитване за определяне на потискането на потреблението на кислород. Като алтернатива, липсата на потискане на потреблението на кислород от изпитвания химикал при предварителни изпитвания може да покаже, че окончателно изпитване не е необходимо, но следва да бъде включено трикратно повторение на предварителното изпитване при най-високата изпитвана концентрация (обикновено 1 000 mg/l, но в зависимост от изискването за данни).

Таблица 1

Примери за смеси за предварителното изпитване

Реактив	Първоначалната концентрация				
Изходен разтвор на изпитвания химикал:	10 g/l				
Изходен разтвор на синтетична среда	Вж. точка 16				
Изходна суспензия на активна утайка	3 g/l суспендирани твърди вещества				
Компоненти на смеси	Дозиране в съдовете за изпитване (*)				
	F _{T1}	F _{T2}	F _{T3-5}	F _{B1-2}	F _A
Изходен разтвор на изпитвания химикал (ml) (точки 19—21)	0,5	5	50	0	50
Изходен разтвор от синтетични отпадъчни води (ml) (точка 16)	16	16	16	16	16
Суспензия на активна утайка (ml) (точки 26—29)	250	250	250	250	0
Вода (точка 15)	233,5	229	184	234	434
Общ обем на смеси (ml)	500	500	500	500	500
Концентрации в сместа					
Изпитвана суспензия (mg/l) Активна утайка	10	100	1 000	0	1 000
(суспендирани твърди вещества) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

(*) Същата процедура трябва да бъде следвана с референтния химикал, за колби F_{R1-3}

40. Изпитването следва да се извършва с използване най-малко на три концентрации на изпитвания химикал, например 10 mg/l, 100 mg/l и 1 000 mg/l с празна контролна проба и, ако е необходимо, най-малко три абиотични контроли с най-високите концентрации на изпитвания химикал (вж. като пример Таблица 1). В идеалния случай най-ниската

▼ **M6**

концентрация следва да не оказва въздействие върху потреблението на кислород. Ако е относимо, следва да се изчислят скоростите на усвояването на кислород и скоростта на нитрификацията; след това следва да се изчисли процентът на потискане. В зависимост от целта на изпитването, също така е възможно просто да се определи токсичността при пределна концентрация, например 1 000 mg/l. Ако не се наблюдава статистически значим токсичен ефект при тази концентрация, не е необходимо по-нататъшно изпитване при по-високи или по-ниски концентрации. Следва да се отбележи, че малко разтворимите във вода вещества, смесите с компоненти с различна разтворимост във вода и адсорбиращите се вещества следва да се претеглят директно в съдовете за изпитване. В този случай обемът, запазен за изходния разтвор на изпитваното вещество, следва да бъде заменен с вода за разреждане.

Окончателно изпитване

Потискане на общото усвояване на кислород

41. Изпитването следва да се извършва с използване на диапазон от концентрации, получен въз основа на предварителното изпитване. С цел да се получи както NOEC, така и EC_x (напр. EC_{50}), в повечето случаи се препоръчват шест контроли и пет концентрации на третиране в геометрична прогресия, с пет повторения. За абиотичната контрола не е необходимо повторение, ако не е установено усвояване на кислород при предварителното изпитване, но ако се установи значително усвояване, трябва да бъдат включени абиотични контроли за всяка концентрация на изпитвания химикал. Чувствителността на утайката трябва да се провери, като се използва референтен химикал 3,5-дихлорофенол. Тъй като е известно, че чувствителността варира, чувствителността на утайката трябва да бъде проверявана за всяка поредица от изпитвания. Във всички случаи, пробите се изваждат от съдовете за изпитване след 3 часа и допълнително след още 30 минути, ако е необходимо, за измерване на скоростта на усвояване на кислород в камерата с кислороден електрод. От събраните данни се изчисляват конкретните скорости на дишането за контролните и изпитваните смеси; след това процентът на потискане се изчислява по уравнение 7 по-долу.

Разграничаване между потискане на хетеротрофното дишане и на дишането, дължащо се на нитрификация

42. Използването на специфичен инхибитор на нитрификацията, ATU, дава възможност за пряка оценка на потискащото въздействие на изпитвани химикали върху хетеротрофното окисляване, и въздействието върху скоростта на дишането, дължащо се на нитрификация, може да бъде изчислено чрез изваждане на скоростта на усвояването на кислород в присъствието на ATU от общата скорост на усвояването (при отсъствие на ATU). В съответствие с планирането на изпитванията за EC_x или NOEC, описано в точка 41, следва да се изготвят два набора от реакционни смеси, но в допълнение следва да се добави ATU към всяка смес от даден набор в крайна концентрация от 11,6 mg/l, за която има данни, че потиска напълно нитрификацията в утайка със суспендирани твърди вещества в концентрации до 3 000 mg/l (4). Скоростите на усвояването на кислород следва да се измерват след периода на експозиция; тези директни стойности представляват само хетеротрофното дишане, а различията между тях и съответните общи скорости на дишането представляват нитрификацията. След това се изчисляват различните степени на потискане.

Измервания

43. След периода(ите) на експозиция проба от първия съд за аериране следва да бъде прехвърлена в камерата с кислороден електрод (фигура 1 от допълнение 2) и незабавно следва да бъде измерена концентрацията на разтворения кислород. Ако на разположение има система с множество електроди, могат да се извършат едновременни измервания. От съществено значение е разбъркването (посредством магнит с покритие) да е със същата скорост, както при калибрирането на електрода, за да се гарантира, че електродът отговаря с минимално

▼ **M6**

забавяне на променящите се концентрации на кислород, и да се осигури възможност за регулярни и възпроизводими измервания на кислорода в съда за измерване. Обикновено системата от няколко саморазбърквачи се кислородни електроди е достатъчна. Камерата трябва да се изплаква с вода между измерванията. Като алтернатива, пробата може да се използва за запълване на бутилка за БПК (фигура 2 от допълнение 3), снабдена с магнитна бъркалка. След това в гърлото на бутилката се вкарва кислороден електрод с адаптираща се втулка и се стартира магнитната бъркалка. И в двата случая концентрацията на разтворения кислород следва да се измерва и записва непрекъснато през даден период, обикновено от 5 до 10 минути, или докато концентрацията на кислорода падне под 2 mg/l. Електродът се отстранява, сместа се връща в съда за аериране и се продължава с аерирането и разбъркването, ако е необходимо измерване след по-дълги периоди на експозиция.

Проверка на концентрацията на изпитвания химикал

44. За някои цели може да е необходимо да се измери концентрацията на изпитвания химикал в съдовете за изпитване. Следва да се отбележи, че ако се използват изходни разтвори на:

- слабо разтворими във вода вещества,
- смеси, чиито компоненти са с различна разтворимост във вода, или
- вещества с голяма разтворимост във вода, но при които концентрацията на изходния разтвор е близка до максималната разтворимост във вода,

разтворената фракция е неизвестна, и действителната концентрация на изпитвания химикал, прехвърлян в съдовете за изпитване, не е известна. За характеризиране на експозицията е необходима аналитична оценка на концентрациите на изпитвания химикал в съдовете за изпитване. С цел опростяване, аналитичната оценка следва да се извършва преди добавянето на инокулума. Поради факта, че само разтворените фракции ще бъдат прехвърлени в съдове за изпитване, измерените концентрации могат да бъдат много ниски.

45. За да се избегнат отнемачи време и скъпо струващи анализи, препоръчва се изпитваният химикал да се претегля директно в съдовете за изпитване и при последващите изчисления да се прави позоваване на първоначалната претеглена номинална концентрация. Не е необходимо разграничаване между разтворени, неразтворени или адсорбирани фракции на изпитвания химикал, тъй като всички тези фракции съществуват и в реални условия в една пречиствателна станция за отпадъчни води, като тези фракции могат да варират в зависимост от състава на отпадъчните води. Целта на настоящия метод за изпитване е да се направи реалистична оценка за концентрацията, при която не се наблюдава подтискане, и той не е подходящ за проучване кои фракции допринасят за подтискане на организмите в активната утайка. Накрая, адсорбиращите се вещества също следва да се претеглят директно в съдовете за изпитване; и съдовете следва да бъдат силанизирани с цел да се сведат до минимум загубите чрез адсорбция.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Изчисляване на скоростите на усвояването на кислород**

46. Скоростите на усвояването на кислород следва да се изчисляват на базата на средноаритметичната стойност от измерените стойности, напр. от линейната част на графиките на концентрацията на кислород в зависимост от времето, като изчисленията се ограничават за концентрации на кислород между 2,0 mg/l и 7,0 mg/l, тъй като по-високите и по-ниските концентрации могат сами по себе си да повлияят скоростта

▼ **M6**

на потребление. Преминаването в области от концентрации под или над тези стойности понякога е неизбежно и необходимо, например, когато дишането е силно потиснато и следователно е много бавно, или ако дишането на дадена активна утайка е много бързо. Това е приемливо, при условие че разширените участъци от графиката на усвояването са прави и техните градиенти не се променят при преминаването през границите от 2,0 mg/l или 7,0 mg/l O₂. Всякакви извити части на графиката показват, че системата за измерване е в процес на стабилизиране, или че скоростта на усвояване се променя, и не следва да се използват за изчисляването на скоростите на дишане. Скоростта на усвояването на кислород следва да се изразява в милиграми на литър на час (mg/lh) или в милиграми на грам суха утайка на час (mg/gh). Скоростта на потреблението на кислород, R в mg/lh, може да бъде изчислена или интерполирана от линейната част на графиката със записаните данни за намалението на кислорода съгласно уравнение 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \quad (1)$$

където:

Q₁ е концентрацията на кислорода в началото на избрания участък от линейната фаза (mg/l);

Q₂ е концентрацията на кислорода в края на избрания участък от линейната фаза (mg/l);

Δ_t е времевият интервал между тези две измервания (мин.).

47. Специфичната скорост на дишане (RS) се изразява като количеството усвоен кислород на g сухо тегло на утайка на час (mg/gh) съгласно уравнение 2:

$$R_s = R/SS \quad (2)$$

където SS е концентрацията на суспендираните твърди вещества в изпитваната смес (g/l).

48. Различните индекси на R, които могат да се съчетават, са:

S специфична скорост

T обща скорост на дишане

N скорост на дишането, дължащо се на нитрификация

H скорост, дължаща се на хетеротрофното дишане

A скорост, дължаща се на абиотични процеси

V скорост, основаваща се на празни проби (средна)

Изчисляване на скоростта на усвояването на кислород, дължащо се на нитрификация

49. Връзката между общото дишане (R_T), дишането, дължащо се на нитрификация (R_N) и хетеротрофното дишане (R_H) се изразява с уравнение 3:

$$R_N = R_T - R_H \quad (3)$$

където:

R_N е скоростта на усвояването на кислород, дължащо се на нитрификация (mg/lh);

R_T е измерената скорост на усвояването на кислород от празната контрола (без ATU; F_B) (mg/lh).

R_H е измерената скорост на усвояването на кислород от празната контрола с добавен ATU (F_N) (mg/lh).

▼ **M6**

50. Това съотношение е валидно за стойностите на празните проби (R_{NB} , R_{TB} , R_{HB}), абиотичните контроли (R_{NA} , R_{TA} , R_{HA}) и изследванията с изпитвани химикали (R_{NS} , R_{TS} , R_{HS}) (mg/gh). Специфичните скорости на дишане се изчисляват от:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Ако стойността на R_N не е значима (например $< 5\%$ от R_T в празни контроли) при предварително изпитване, може да се допусне, че хетеротрофното усвояване на кислород е равно на общото усвояване и че не протича нитрификация. Ако при изпитванията трябва да се разглеждат въздействията върху хетеротрофните и нитрифициращите микроорганизми, би бил необходим алтернативен източник на активна утайка. Окончателно изпитване се провежда при наличие на доказателства за потискане на скоростите на усвояването на кислород при различни концентрации на изпитвания химикал.

Изчисляване на процента на потискане

52. Процентът на потискане, I_T , на общото потребление на кислород при всяка концентрация на изпитвания химикал, се определя по уравнение 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\% \quad (7)$$

53. Аналогично, процентът на потискане на хетеротрофното усвояване на кислород I_H при всяка концентрация на изпитвания химикал, се определя по уравнение 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100\% \quad (8)$$

54. Накрая, потискането на усвояването на кислород I_N , дължащо се на нитрификация, при всяка концентрация, се определя по уравнение 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{NB})] \times 100\% \quad (9)$$

55. Процентът на потискане на усвояването на кислород следва да се нанесе на графиката спрямо логаритъма на концентрацията на изпитвания химикал (крива на потискане, виж фигура 3 от допълнение 4). Кривите на потискане се начертават за всеки период на аериране от 3 часа (h) или допълнително след 30 min. Концентрацията на изпитвания химикал, която възпрепятства усвояването на кислород с 50% (EC_{50}), следва да бъде изчислена или интерполирана от графиката. Ако са налични подходящи данни, могат да бъдат изчислени или интерполирани 95%-ни доверителни граници на EC_{50} , наклонът на кривата и подходящи стойности за отбелязване на началото на потискането (например EC_{10} или EC_{20}) и края на диапазона на потискането (например EC_{80} или EC_{90}).
56. Следва да се отбележи, че с оглед на варирането, често наблюдавано при резултатите, в много случаи може да е достатъчно допълнително изрязване на резултатите като порядък, например:

$$EC_{50} < 1 \text{ mg/l}$$

$$EC_{50} \text{ 1 mg/l до 10 mg/l}$$

$$EC_{50} \text{ 10 mg/l до 100 mg/l}$$

$$EC_{50} > 100 \text{ mg/l}$$

Интерпретиране на резултатите

EC_x

▼ **M6**

57. Стойностите на EC_x , включително свързаните с тях долни и горни 95 %-ни доверителни граници за параметъра, се изчисляват с помощта на подходящи статистически методи (например пробит-анализ, логистична функция или функция на Вейбул, метод на Спирмън-Карбър с изключване на данни, или обикновена интерполация (11)). Стойност на EC_x се получава чрез добавяне на стойност, съответстваща на x % от средната стойност на контролна проба в уравнението. За изчисляване на EC_{50} или всяка друга стойност EC_x , средните стойности от всяко третиране (x) следва да бъдат подложени на регресионен анализ.

Оценка на NOEC

58. Ако със статистическия анализ се цели определяне на NOEC, необходими са статистики за всеки отделен съд (индивидуалните съдове се разглеждат като повторения). Трябва да се използват подходящи статистически методи съгласно документа на ОИСР относно настоящите подходи за статистически анализ на данни за екоотоксичност (Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data): ръководство за прилагане (11). По принцип неблагоприятните въздействия на изпитвания химикал в сравнение с контролата се проучват чрез проверяване на (по-малката) едностранна хипотеза при $p \leq 0,05$.

Протокол от изпитването

59. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал

- общоприето наименование, химично наименование, номер по CAS, чистота;
- физични и химични свойства на изпитвания химикал (напр. $\log K_{ow}$, разтворимост във вода, парно налягане, константа на Хенри (H) и евентуална информация относно съдбата на изпитвания химикал, напр. адсорбция в активна утайка);

Система за изпитване

- източник, условия на експлоатацията на станцията за пречистване на отпадъчни води и получавани от нея входящи води, концентрация, предварителна обработка и поддръжка на активната утайка;

Условия на изпитването

- температура на изпитване, рН по време на изпитването и продължителност на фазата(ите) на експозицията;

Резултати

- специфично потребление на кислород на контролите ($mg\ O_2/(g\ утайка \times h)$);
- всички данни от измерванията, крива(и) на потискане и метод за изчисляване на EC_{50} ;
- EC_{50} и, ако е възможно, 95 %-ни доверителни граници, евентуално EC_{20} , EC_{80} ; евентуално NOEC и използваните статистически методи, ако EC_{50} не може да се определи;
- резултати за общото и, ако е подходящо, за хетеротрофното потискане и за потискането на нитрификацията;
- абиотично усвояване на кислород във физичните и химичните свойства на контролата (ако се използва);
- наименование на референтния химикал и резултати при този химикал;
- всички наблюдения и отклонения от стандартната процедура, които може да са оказали влияние върху резултата.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Brown, D., Hitz, H.R. and Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245-261.

▼ M6

- (2) King, E. F. and Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.
- (3) OECD (1984), Activated sludge, Respiration inhibition test, Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (4) ISO (2007). ISO 8192 Water Quality- Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation, International Organization for Standardization.
- (5) Bealing, D. J. (2003). Document ISO/TC147/WGI/N.183, International Organization for Standardization.
- (6) Painter, H A, Jones K (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.
- (7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.
- (8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.
- (9) Fiebig S. and Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test — acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.
- (10) ISO (1995). ISO 10634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium, International Organization for Standardization.
- (11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

▼ M6*Допълнение 1***Определения**

В настоящия метод за изпитване са приложими следните определения:

Химикал означава вещество или смес.

ЕС_x (ефективна концентрация, при която се наблюдава x % от въздействието) е концентрацията, която причинява x % от дадено въздействие върху изпитвани организми в рамките на даден период на експозиция, при сравнение с контрола. Например ЕС₅₀ е концентрация, за която е направена оценка, че предизвиква дадено въздействие върху изпитвана крайна точка в 50 % от експонираната популация в рамките на определен период на експозиция.

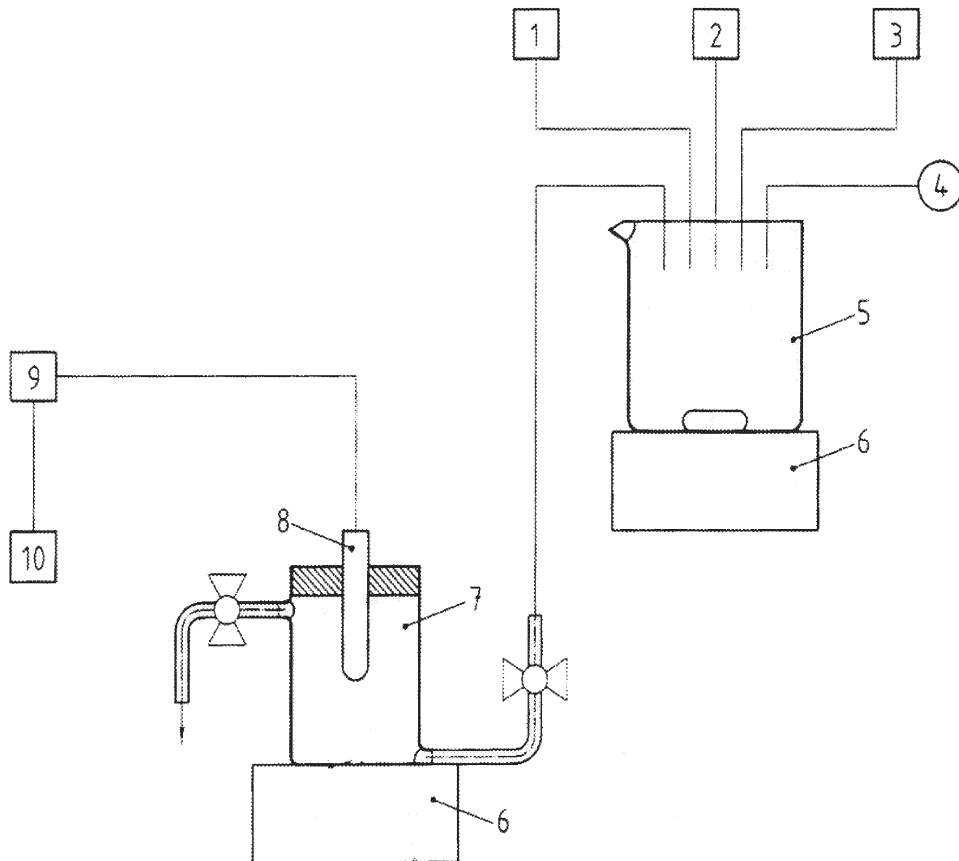
Концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC) е концентрацията на изпитвания химикал, при която не се наблюдава въздействие. В настоящото изпитване концентрацията, съответстваща на NOEC, няма статистически значимо ($p < 0,05$) въздействие в рамките на даден период на експозиция, при сравнение с контролата.

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

▼ **M6**

Допълнение 2

Фиг. 1: Примери за единица за измерване



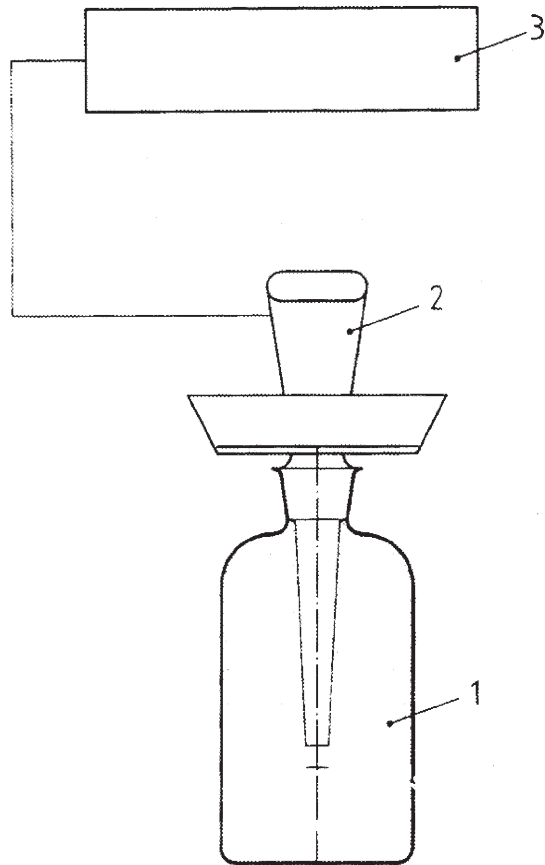
Легенда

- | | |
|--------------------|---------------------------------------|
| 1 активна утайка; | 6 Магнитна бъркалка |
| 2 синтетична среда | 7 камера за измерване на кислород |
| 3 изпитван химикал | 8 кислороден електрод |
| 4 въздух | 9 инструмент за измерване на кислород |
| 5 съд за смесване | 10 записващо устройство |

▼ M6

Допълнение 3

Фиг. 2: Пример за единица за измерване с използване на бутилка за БПК

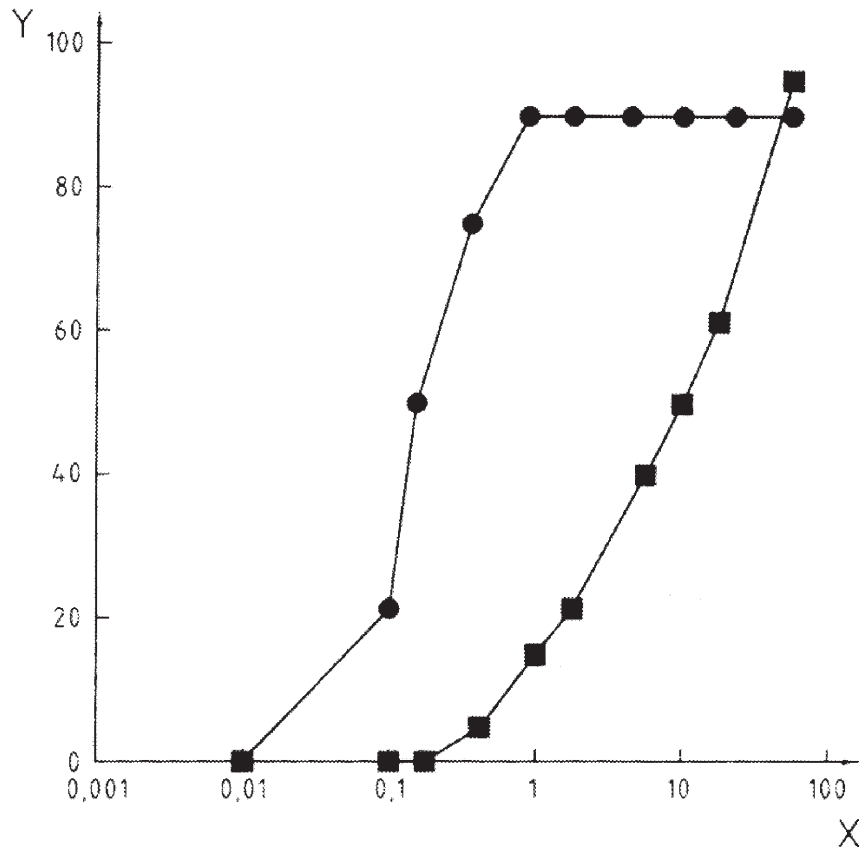
*Легенда*

- 1 съд за извършване на изпитването
- 2 кислороден електрод
- 3 инструмент за измерване на кислород

▼ M6

Допълнение 4

Фиг. 3: Пример за крива на потискане



Легенда

X концентрация на 3,5-дихлорофенол (mg/l)

Y потискане (%)

■ потискане на хетеротрофното дишане с използване на нитрифицираща утайка

● потискане на нитрификацията с използване на нитрифицираща утайка.



В.12. БИОЛОГИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ.

МОДИФИЦИРАНО SCAS ИЗПИТВАНЕ

1. МЕТОД

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Целта на метода е да оцени потенциалната крайна биологична разградимост на разтворими във вода нелетливи органични вещества, когато са подложени на експозиция на относително високи концентрации на микроорганизми за продължителен период от време. През този период жизнеспособността на микроорганизмите се поддържа чрез ежедневно подхранване с утаени отпадъчни води. (За нуждите в края на седмицата, отпадъчните води могат да бъдат съхранявани при температура 4 °С. Алтернативно, може да се използват синтетичните отпадъчни води от потвърдителното изпитване на ОИСР.

Възможно е да настъпи физико-химична адсорбция на суспендираните твърди вещества и това трябва да се вземе предвид при интерпретирането на резултатите (вижте 3.2).

Поради дългия период на задържане на течната фаза (36 часа) и периодичното добавяне на хранителни вещества, изпитването не симулира условията, възникващи в пречиствателната станция за отпадъчни води. Резултатите, получени с различни изпитвани вещества, показват, че методът притежава висок потенциал за биологично разграждане.

Условията на изпитването са много благоприятни за селекция и/или адаптиране на микроорганизми, които са способни да разградят изпитваното съединение. (Процедурата може да се използва и за получаване на аклиматизирани проби за инокулиране за използване при други изпитвания.)

При този метод концентрацията на разтворения органичен въглерод се използва за оценяване на крайната биологична разградимост на изпитваните вещества. Предпочита се РОВ да се определя след подкиселяване и продухване, а не като разликата $C_{\text{общ}} - C_{\text{неорганичен}}$.

Едновременното използване на специфичен аналитичен метод може да даде възможност за оценка на първичното биологично разграждане на веществото (изчезването на родителската химична структура).

Методът е приложим само за тези изпитвани органични вещества, които в използваната за изпитването концентрация:

- са разтворими във вода (най-малко 20 mg разтворен органичен въглерод/l),
- имат пренебрежимо ниско парно налягане,
- не потискат развитието на бактериите,
- не се абсорбират в значителна степен в експерименталната система,
- не се губят при образуване на пяна в изпитвания разтвор=

Трябва да се определи съдържанието на органичен въглерод в изпитвания материал.

▼B

Информацията за относителните пропорции на основните компоненти на изпитвания материал ще бъдат полезни за интерпретиране на получените резултати, по-конкретно в случаите, когато резултатите са ниски или гранични.

Информацията за токсичността на веществото за микроорганизмите може да бъде полезна за интерпретиране на ниски резултати и за избор на подходяща експериментална концентрация.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ЕДИНИЦИ

C_T = концентрация на изпитваното вещество като органичен въглерод, намиращ се или добавян към утаена отпадъчна вода в началото на аерирането (mg/l),

C_t = концентрация на разтворения органичен въглерод, намиращ се в надстоящата течност от изпитването в края на аерирането (mg/l),

C_c = концентрация на разтворения органичен въглерод, намиращ се в надстоящата течност от контролата в края на аерирането (mg/l).

При този метод биологичното разграждане се определя като изчезване на органичния въглерод. Биологичното разграждане може да бъде изразено като:

1. Процент на отнемане D_{da} на количеството ежедневно добавяно вещество.

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \quad [1]$$

където

D_{da} = разграждане/ежедневно добавяне.

2. Процентното отнемане D_{ssd} на количеството вещество, в наличност в началото на всеки ден:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad 2(a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2(б)]$$

където

D_{ssd} = разграждане/вещество в началото на деня;

индексите i и $(i + 1)$ се отнасят до деня на измерването.

Уравнението 2(a) се препоръчва, ако РОВ в изходящата течност варира от ден на ден, докато уравнение 2(б) може да се използва, когато РОВ в изходящата течност остава относително постоянен от ден на ден.

▼B**1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ**

В някои случаи при изследване на нови вещества може да са полезни вещества за сравнение. Все още обаче не могат да бъдат препоръчани конкретни вещества за сравнение.

Представени са данните за няколко съединения, оценени с кръгови тестове (вижте допълнение 1), главно за да може се провежда от време на време калибриране на метода и да позволи сравняване на резултатите, когато се използва друг метод.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Активираната утайка от станцията за пречистване на отпадъчни води се поставя в модул за полунепрекъснато изпитване с активирана утайка (SCAS). Добавят се изпитваното съединение и утаената битова отпадъчна вода и сместа се аерира в продължение на 23 часа. След това аерирането спира, утайката се оставя да се утаи и надстоящата течност се отстранява.

След това утайката, оставаща в камерата за аериране, се смесва с допълнителна порция изпитвано съединение и отпадъчна вода и цикълът се повтаря.

Биологичното разграждане се установява посредством определяне съдържанието на разтворения органичен въглерод в настоящата течност. Тази стойност се сравнява със стойността, определена за течността, която е получена от контролна епруветка, дозирана само с утаена отпадъчна вода.

Когато се използва специфичен аналитичен метод, могат да се измерят промените в концентрацията на родителската молекула поради биологично разграждане (първична биологична разградимост).

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Все още не е установена възпроизводимостта на този метод въз основа на отнемането на разтворения органичен въглерод. (Когато се взема предвид първичното биологично разграждане, се получават много точни данни за материали, които се разграждат във висока степен.)

Чувствителността на метода в голяма степен се определя от вариационността на празната проба и, в по-малка степен, от точността на определянето на разтворения органичен въглерод и от нивото на изпитваното съединение в течността в началото на всеки цикъл.

1.6. ОПИСАНИЕ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНАТА ПРОЦЕДУРА**1.6.1. Подготовка**

Могат да се използват достатъчен брой чисти модули за аериране, алтернативно може да се използва оригиналният модул за SCAS изпитване от 1,5 l, като се поставят тръбички за аериране (фигура 1) за всяко изпитвано вещество и контролите. Сгъстеният въздух, захранващ експерименталните модули, е пречистен през филтър от памучна вата и не трябва да съдържа органичен въглерод, както и трябва да бъде предварително наситен с вода за намаляване на загубите от изпарение.

От активирана утайка от станция за пречистване главно на битови отпадъчни води се получава проба смесена течност, съдържаща 1 до 4 g/l суспендирани твърди вещества. За всяка модул за аериране са необходими приблизително 150 ml смесена течност.

▼B

Изходните разтвори на изпитваното вещество се приготвят с дестилирана вода. Нормално необходимата концентрация е 400 mg/l, като органичният въглерод дава концентрация 20 mg/l въглерод за изпитваното съединение в началото на всеки цикъл на аериране, ако не настъпва биологично разграждане.

Ако токсичността за микроорганизмите разрешава, позволени са и по-високи концентрации.

Измерва се съдържанието на органичен въглерод в изходните разтвори.

1.6.2. Условия на изпитване

Изпитването трябва да се провежда при температура от 20 до 25 °C.

Използва се по-висока концентрация на аеробни микроорганизми (от 1 до 4 g/l суспендирани твърди вещества) и ефективният период на задържане е 36 часа. Съдържащият въглерод материал в захранващите отпадъчни води се окислява екстензивно, нормално в рамките на осем часа след началото на всеки цикъл на аериране. Впоследствие утайката има само ендогенно дишане през остатъка от аерирането, като през това време единственият съществуващ субстрат е изпитваното съединение, освен ако то също не се метаболизира лесно. Тези характеристики, комбинирани с ежедневно повторно инокулиране с използване на битови отпадъчни води като среда, създават много благоприятни условия както за аклиматизиране, така и за високи степени на биологично разграждане.

1.6.3. Провеждане на изпитването

Получава се проба смесена течност от подходяща станция за предимно битова активирана утайка или от лабораторен модул, като тя се съхранява при аеробни условия, докато се използва в лабораторията. Всеки модул за аериране, а също всеки контролен модул се напълват със 150 ml смесена течност (ако се използва оригиналният модул за SCAS изпитване, умножете дадените обеми по 10) и се започва аериране. След 23 часа аерирането се спира и утайката се оставя да се утаи за 45 минути. Кранът на всеки съд се отваря и се изтеглят 100 ml порции от надстоящата течност. Непосредствено преди използването се получава проба от утаена битова отпадъчна вода и към утайката, оставаща във всеки модул за аериране, се добавят по 100 ml от нея. Аерирането започва отново. На този етап не се добавят материали за изпитване и модулите се захранват ежедневно с битова отпадъчна вода само докато при утаяването се получи бистра надстояща течност. Това обикновено отнема две седмици, до което време разтвореният органичен въглерод в надстоящата течност в края на всеки цикъл на аериране достига постоянна стойност.

В края на този период индивидуалните утаени утайки се смесват и към всеки модул се добавят по 50 ml от получената смесена утайка.

Към контролните модули се добавят по 95 ml от утаената отпадъчна вода и 5 ml от водата, а към експерименталните модули се добавят 95 ml от утаената отпадъчна вода плюс 5 ml от изходния разтвор на съответното изпитвано съединение (400 mg/l). Аерирането започва отново и продължава 23 часа. След това утайката се оставя да се утаи в продължение на 45 минути, изтегля се надстояща течност и се анализира за съдържание на разтворен органичен въглерод.

Горната процедура на напълване и изтегляне се повтаря ежедневно по време на цялото изпитване.

▼B

Преди утаяването може да се наложи почистване на стените на модулите за предотвратяване акумулирането на твърди вещества над нивото на течността. За всеки модул се използват отделна стъргалка и четка за предотвратяване на кръстосано замърсяване.

В идеалния случай разтвореният органичен въглерод в надстоящата течност се определя ежедневно, въпреки че е разрешено и по-рядко анализиране. Преди анализите течността се филтрира през промити мембранни филтри с размер на порите 0,45 µm или се центрофугира. Мембранните филтри са подходящи, ако е сигурно, че те нито освобождават въглерод, нито абсорбират веществото по време на филтрирането. Докато се намира в центрофугата, температурата на пробата не трябва да надвишава 40 °C.

Продължителността на изпитването за съединения, демонстриращи слабо или липсващо биологично разграждане, е неопределена, но въз основа на опита може да се предположи, че тя трябва да бъде обикновено не по-малка от 12 седмици, но не по-голяма от 26 седмици.

2. ДАННИ И ОЦЕНКА

От стойностите на разтворения органичен въглерод в надстоящата течност от експерименталните и контролните модули се построява графика срещу времето.

При постигане на биологично разграждане нивото, достигнато при изпитването, се доближава до нивото, достигнато при контролите. След като се установи, че разликата между двете нива е постоянна в продължение на три последователни измервания, правят се такъв брой допълнителни измервания, че да бъдат достатъчни за статистическа обработка на данните. и се изчислява процентът на биологично разграждане на изпитваното съединение (D_{da} или D_{ssd} , вижте 1.2).

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Ако е възможно, протоколът от изпитването съдържа следното:

— цялата информация за типа отпадъчна вода, типа използвани модули и експерименталните резултати, отнасящи се до изпитваното вещество, веществото за сравнение, ако се използва, и празната проба,

— температурата,

— кривата на отнемане с описание, начина на изчисляване (вижте 1.2),

— дата и място на вземане на проби от активирана утайка и отпадъчни води, състояние на адаптиране, концентрация и т.н.,

— научните мотиви за всички изменения в експерименталната процедура,

— подпис и дата.

▼B**3.2. ИНТЕРПРЕТИРАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Тъй като веществото, което се изпитва по този метод, няма да подлежи на лесно биологично разграждане, отстраняването на РОВ, дължащо се единствено на биологично разграждане, нормално ще бъде постепенно в продължение на дни или седмици, освен в случаи, когато аклиматизирането е внезапно, както се вижда от рязкото изчезване, възникващо след няколко седмици.

Физикохимичната адсорбция, обаче, понякога може да играе важна роля. Това се вижда, когато е налице пълно или частично отнемане на добавения в началото РОВ. Какво ще се случи впоследствие, зависи от фактори, като степента на адсорбция и концентрацията на суспендираните твърди вещества в изхвърлената изходяща течност. Обикновено разликата между концентрациите на РОВ в контрола и експерименталните надстоящи течности постепенно нараства в сравнение с първоначалната ниска стойност и, освен ако не настъпи аклиматизиране, тази разлика после остава при новата стойност за останалата част от експеримента.

Ако трябва да се направи разграничение между биологичното разграждане (или частично разграждане) и адсорбцията, са необходими допълнителни изпитвания. Това може да се направи по много начини, но най-убедително е използването на надстоящата течност или утайката като проба за инокулиране в основно изпитване (за предпочитане респирометричен тест).

Изпитваните вещества с високо неадсорбтивно отнемане на РОВ при това изпитване трябва да се приемат за потенциално биологично разградими. Частичното неадсорбтивно отнемане показва, че химическото вещество е подложено на най-малко частично биологично разграждане.

Ниското или близкото до нула отнемане на РОВ може да се дължи на потискане на микроорганизмите от изпитваното вещество и това може да се докаже и чрез лизиране или загуба на утайка, водещо до образуване на мътна надстояща течност. Изпитването трябва да бъде повторено, като се използва по-ниска концентрация на изпитваното вещество.

Използването на специфичен аналитичен метод или маркирано с ^{14}C изпитвано вещество могат да дадат възможност за по-голяма чувствителност. При маркирано с ^{14}C изпитвано съединение възстановяването на $^{14}\text{CO}_2$ ще потвърди, че е настъпило биологично разграждане.

Когато резултатите са дадени и за първичното биологично разграждане, ако е възможно, трябва да бъде дадено обяснение за изменението в химичната структура, която води до загуба на отговор при родителското изпитвано вещество.

Потвърждаването на аналитичния метод трябва да бъде представено заедно с отговора, получен при празната експериментална среда.

4. ПОЗОВАВАНИЯ

- (1) ОИСП, Париж, 1981, *Test Guideline 302 A*, Решение на Съвета С(81) 30 окончателен.

▼ B

Допълнение 1

SCAS изпитване: примерни резултати

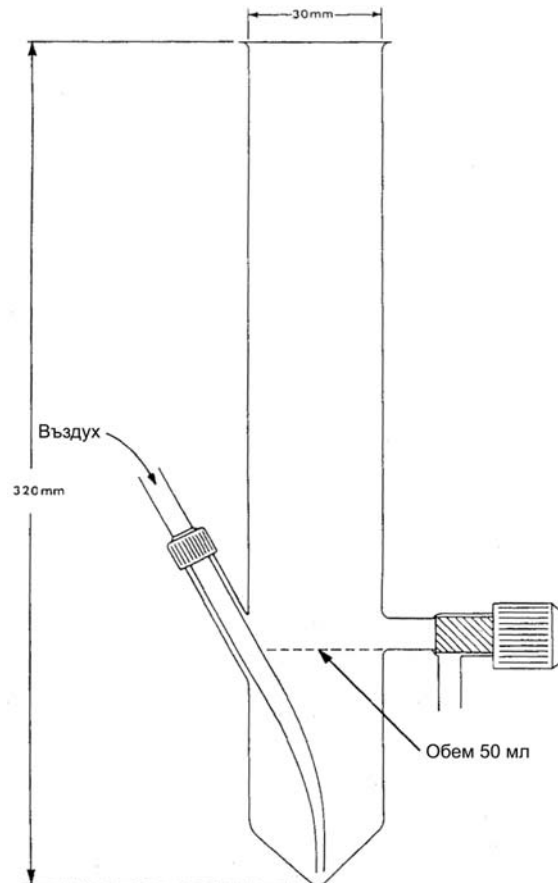
Вещество	C_T (mg/l)	$c_T - c_c$ (mg/l)	Процент на биологично разграждане $D_{да}$	Продължителност на изпитването, (дни)
4-ацетрил-аминобензен	17,2	2,0	85	40
Тетра-пропилен бензен	17,3	8,4	51,4	40
4-нитрофенол	16,9	0,8	95,3	40
Диетилен гликол	16,5	0,2	98,8	40
Анилин	16,9	1,7	95,9	40
Циклопентан тетра карбоксилат	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Допълнение 2

Примерна експериментална апаратура

Фигура 1



▼ M7**V.13. БИОАКУМУЛАЦИЯ В РИБИ: ЕКСПОЗИЦИЯ ПО ВОДЕН ПЪТ И ЧРЕЗ ХРАНИТЕЛНИЯ РЕЖИМ****ВЪВЕДЕНИЕ**

Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 305 (2012). Основната цел на това преразглеждане на метода за изпитване е в две направления. На първо място, то цели да се включи изпитване на биоаккумуляцията чрез хранителен режим ⁽¹⁾, подходящо за определяне на потенциала за биоаккумуляция на веществата с много малка разтворимост във вода. На второ място, то има за цел създаването на метод за изпитване, който, когато е целесъобразно, използва по-малко риба от съображения за хуманно отношение към животните, и който е икономически по-ефективен.

В годините след приемането на консолидирания метод за изпитване V.13 (1) са били изпитани редица вещества и е натрупан значителен опит както от лаборатории, така и от регулаторните органи. Това доведе до убеждението, че сложността на изпитването може да бъде намалена, ако са изпълнени определени критерии (срв. с точка 88), и че е възможен поетапен подход. Опитът показва също така, че биологични фактори като растежа и съдържанието на липиди в рибата могат да окажат силно влияние върху резултатите и може да е необходимо да се вземат предвид. Освен това се признава, че изпитването на много малко разтворими във вода вещества може да не е технически осъществимо. В допълнение, за много малко разтворими във вода вещества във водна среда експозицията по воден път може да е от ограничено значение в сравнение с пътя чрез хранителния режим. Това доведе до разработването на метод за изпитване, в който експозицията на рибата е чрез нейния хранителен режим (вж. точки 7-14 и 97 по-нататък). Валидирането (кръговото изпитване) на метода с експозиция чрез хранителния режим е проведено през 2010 г. (51).

Основните промени включват:

- Изпитването на само една концентрация за изпитване може да се счита за достатъчно, когато е вероятно коефициентът на биоконцентрация (BCF) да не зависи от изпитваната концентрация.
- План за изпитването със сведена до минимум експозиция по воден път, в който е възможен ограничен брой точки на пробовземане, ако са изпълнени определени критерии.
- Съдържанието на липиди в рибата следва да се измерва така, че BCF да може да бъде изразен на основата на 5 % съдържание на липиди.
- По-голям акцент върху оценката на кинетичния BCF (когато е възможно), освен оценката на BCF в стационарно състояние.
- За някои групи от вещества се предлага изпитване с експозиция чрез хранителния режим, когато това се счита за по-подходящо от изпитване с експозиция по воден път.
- Теглото на рибата следва да се измерва, така че BCF_k да може да бъде коригиран за понижаване на концентрацията в резултат от растеж.

Преди провеждане някое от изпитванията за биоаккумуляция трябва да бъде известна следната информация за изпитваното вещество:

- a) чувствителност на аналитичния метод за измерване на концентрацията в тъканите, във водната среда или в храната както на изпитваното вещество, така и на възможни метаболити (вж. точка 65).
- b) разтворимост във вода [МИ А.6]; (2)]; това следва да се определи в съответствие с метод, който е подходящ за (предполагемия) обхват на разтворимостта, за да се получи надеждна стойност. За хидрофобни вещества това обикновено е методът на елуиране от колона.

⁽¹⁾ Вж. допълнение 1 за определения и мерни единици

▼ M7

- в) Коефициент на разпределение *n*-октанол—вода, K_{OW} ⁽¹⁾ [МИ А.8 (4), А.24 (5), А.23 (6)]; или друга подходяща информация за поведението при разпределение (напр. сорбция върху липиди, K_{OC}); това следва да се определи в съответствие с метод, който е подходящ за (предполагамия) обхват на K_{OW} , за да се получи надеждна стойност. За хидрофобни вещества това обикновено е методът с бавно разбъркване [МИ А.23 (6)];
- г) Стабилност на веществото във вода (хидролиза [МИ В.7 (7)]);
- д) Стабилност на веществото в храни (особено при избор на метод за изпитване с експозиция чрез хранителния режим);
- е) Информация относно фототрансформацията, относима към условията на облъчване в изпитването (8);
- ж) Повърхностно напрежение (т.е. за вещества, при които $\log K_{OW}$ не може да се определи) [МИ А.5 (9)];
- з) Парно налягане [МИ А.4 (10)];
- и) Всякаква информация относно биотично или абиотично разграждане във вода, като например (но не единствено) пълна биоразградимост [МИ В.4 части от II до VII (11), В.29 (12)], при необходимост;
- й) Информация за метаболити: структура, $\log K_{OW}$, образуване и разградимост, при необходимост;
- к) Константа на киселинна дисоциация (pK_a) за вещества, които могат да се йонизират. Ако е необходимо, рН на водата за изпитване трябва да се коригира, за да се гарантира, че веществото е в нейонизирана форма при изпитването, ако това е съвместимо с рибния вид.

Независимо от избрания метод на експозиция или схема за вземане на проби, настоящият метод за изпитване описва процедура за характеризане на потенциала за биоаккумуляция на вещества в риба. Въпреки че проточните режими за изпитване са за предпочитане, полустатичните режими също са допустими, при условие че критериите за валидност (срв. точки 24 и 113) са изпълнени. При пътя на експозиция чрез хранителния режим проточната система не е необходима за поддържане на концентрации на изпитваното вещество във вода, но допринася за поддържане на достатъчни концентрации на разтворения кислород, за осигуряване на чиста вода и за отстраняване влияниия, напр. от продукти от екскреция.

Независимо от избрания метод за изпитване, в настоящия метод за изпитване са дадени достатъчно подробности за извършване на изпитването, като същевременно се допуска достатъчна свобода за адаптиране на плана за опита към условията в отделните лаборатории и по отношение на променящите се характеристики на изпитваните вещества. Прилагането на изпитването за експозиция по воден път е най-подходящо при стабилни органични вещества със стойности на $\log K_{OW}$ между 1,5 и 6,0 (13), но все още може да се прилага за силно хидрофобни вещества (с $\log K_{OW} > 6,0$), ако може да бъде доказана стабилна концентрация на изпитваното вещество във водата и напълно разтворено вещество. Ако не може да бъде доказана стабилна концентрация на изпитваното вещество във водата, изпитване по воден път не би било подходящо и следователно за рибата се изисква подход за изпитване на веществото с експозиция чрез хранителния режим (въпреки че тълкуването и използването на резултатите от изпитването с експозиция чрез хранителния режим може да зависи от правната рамка). Предварителни оценки на коефициента на биоконцентрация (BCF, понякога означаван като K_B) за органични вещества със

⁽¹⁾ Понякога се означава чрез P_{OW} ; определя се чрез по метода „разклашане в стъклена“ в МИ А.8 (4), метода с HPLC в МИ А.24 (54) и метода с бавно разбъркване в МИ А.23 (6). Понякога за определяне на $\log K_{OW}$ се използва техниката с разпределителна колона. Налични са ограничен брой проучвания, при които се използва тази техника, главно за хлорирани бифенили и дибензодиксини (напр. Li and Doucette, 1993) (3). За вещества, които могат да се йонизират, $\log K_{OW}$ следва да се отнася за нейонизираната форма.

▼ M7

стойности на $\log K_{OW}$ до около 9,0 могат да се получат чрез използване на уравнението на Bintein *et al.* (14). Предварителната оценка на коефициента на биоконцентрация за такива силно хидрофобни вещества може да бъде по-висока от стойността на коефициента на биоконцентрация в стационарно състояние (BCF_{SS}), която се очаква да се получи при лабораторни опити, особено когато за предварителната оценка се използва обикновен линеен модел. Параметрите, които характеризират потенциала за биоаккумуляция, включват константата на скоростта на поглъщане (k_1), константите на скоростта на елиминиране, включително константата за скорост на почистване (k_2), коефициента на биоконцентрация в стационарно състояние (BCF_{SS}), кинетичния коефициент на биоконцентрация (BCF_K) и коефициента на биомултипликация от експозиция чрез хранителния режим (BMF) ⁽¹⁾.

Изотопно белязаните изпитвани вещества могат да улеснят анализа на водата, храната и рибните проби, и могат да се използват за определяне дали ще са необходими идентификация и количествено определяне на метаболити. Ако се измерят само общите радиоактивни остатъци (например чрез изгаряне или разтваряне на тъкани), то BCF или BMF се основава на общото количество на базовото вещество, включително всеки задържан метаболит, а също и на асимилирания въглерод. Следователно стойностите на BCF или BMF, базирани на общите радиоактивни остатъци, не могат да се сравняват директно с BCF или BMF, получен при специфичен химичен анализ само на базовото вещество. При изследвания с изотопно белязани вещества, преди анализа могат да бъдат използвани процедури за разделяне като например ТСХ, ВЕТХ или ГХ ⁽²⁾, за да се определи BCF или BMF въз основа на базовото вещество. Когато се прилагат техники за разделяне, следва да се извършат идентификация и количествено определяне на базовото вещество и на относимите метаболити ⁽³⁾ (срв. точка 65), ако BCF или BMF следва да бъде определен въз основа на концентрацията на базовото вещество в рибата, а не от общите изотопно белязани остатъци. Възможно е също така да се комбинира изследване за метаболизма при рибите с изследване на разпределение *in vivo* чрез анализ и идентификация на остатъците в тъканите. Възможността за метаболизъм може да бъде прогнозирана с подходящи инструменти (напр. „QSAR toolbox“ на ОИСП (15) и патентовани QSAR програми).

Решението дали да се извърши изпитване с експозиция по воден път или с експозиция чрез хранителния режим, и при какъв план, следва да се основава на факторите в точка 3, разглеждани заедно с относимата правна рамка. Например за вещества, които имат висок $\log K_{OW}$, но все пак имат значителна разтворимост във вода по отношение на чувствителността на наличните аналитични техники, на първо място трябва да се вземе предвид експозиция по воден път. Възможно е обаче информацията за разтворимостта във вода да не е окончателна за тези хидрофобни типове вещества, следователно преди да се вземе решение кой метод за изпитване да се използва, следва да бъде проучена възможността за приготвяне на стабилни, измерими концентрации на разтваряне във вода (стабилни емулсии не са позволени), приложими за изследване с експозиция по воден път (16). Не е възможно да се дадат точни насоки с предписания относно метода, който да бъде използван, въз основа на „гранични“ критерии за разтворимостта във вода и за коефициента на разпределение октанол-вода, тъй като други фактори (техники за анализ, разграждане, адсорбция и т.н.) могат да окажат подчертано влияние върху приложимостта на метода по причините, изложени по-горе. Независимо от това, при $\log K_{OW}$ над 5 и разтворимост във вода под $\sim 0,01$ — $0,1$ mg/l се отбелязва обхватът от вещества, при които извършването на изпитването с експозиция по воден път може да е с нарастваща трудност.

Трябва да се имат предвид и други фактори, които могат да повлияят на избора на изпитване, включително потенциалът на веществото за адсорбция върху съдовете за изпитване и апаратите, неговата стабилност във воден разтвор спрямо стабилността му в храна за риби (17) (18) и т.н.

Информация за такива практически аспекти може да е налична от други извършени проучвания, отнасящи се за водна среда. В литературата (напр. (19)) е на разположение допълнителна информация относно оценката на аспектите, свързани с извършването на изследвания за биоаккумуляция.

За вещества, за които разтворимостта или поддържането на концентрацията във вода, както и анализът на тези концентрации не ограничават по никакъв

⁽¹⁾ Вж. допълнение I за определения и мерни единици

⁽²⁾ ТСХ: тънкослойна хроматография; ВЕТХ: течна хроматография при високо налягане; ГХ: газова хроматография

⁽³⁾ В някои правни рамки анализът на метаболитите може да бъде задължителен, когато са изгълнени определени условия (срв. точка 65).

▼ **M7**

начин осъществяването на метод с експозиция по воден път, този метод е предпочитан за определяне на потенциала за биоконцентрация на веществото. Във всички случаи следва да се провери, че концентрацията (концентрациите), която следва да се приложи при експозиция по воден път, е в рамките на водоразтворимостта в средите за изпитване. Могат да бъдат използвани различни методи за поддържането на стабилни концентрации на разтвореното изпитвано вещество, например използването на изходни разтвори или системи за пасивно дозиране (например метод на елуиране от колона), ако може да бъде доказано, че могат да бъдат поддържани стабилни концентрации и че средите за изпитване не са изменени в сравнение с препоръчаното в точка 27.

За силно хидрофобни вещества ($\log K_{OW} > 5$ и разтворимост под $\sim 0,01$ — $0,1$ mg/l) извършването на изпитването с експозиция по воден път може да е с нарастваща трудност. Ограниченията могат да се дължат на това, че концентрацията във вода не може да се поддържа на ниво, смятано за достатъчно постоянно (напр. поради сорбция върху стъклото на съдовете за експозиция или поради бързо усвояване от рибата), или че концентрациите във вода, които следва да се прилагат, са толкова ниски, че са в същия обхват като аналитичната граница на количествено определяне⁽¹⁾ или под нея. За тези силно хидрофобни вещества се препоръчва изпитването с експозиция чрез хранителния режим, при условие че изпитването съответства на нуждите на относимата правна рамка и оценката на риска.

За повърхностноактивни вещества следва да се вземе предвид дали е осъществимо изпитване за биоконцентрация по воден път, като се имат предвид свойствата на веществото, в противен случай изследването чрез хранителния режим вероятно е по-подходящо. Повърхностноактивните вещества са агенти, действащи на повърхността, които понижават повърхностното напрежение на границата между две течности. Поради техния амфифилен характер (т.е. съдържат както хидрофилна, така и хидрофобна част) те се натрупват на границата между две фази, като например границата между фази вода—въздух, границата между фази вода—храна, и стълените стени, което затруднява определянето на тяхната концентрация във вода.

Изпитването чрез хранителния режим може да заобиколи някои аспекти на експозицията за сложни смеси със съставки с различни граници на разтворимост във вода, така че сравнима експозиция за всички съставки на сместа да е по-вероятна при този метод, отколкото при метода по воден път (срв. (20)).

Следва да се отбележи, че подходът чрез хранителния режим дава коефициент на биомултипликация от експозиция чрез хранителния режим (BMF), а не коефициент на биоконцентрация (BCF)⁽²⁾. Съществуват подходи за оценка на кинетичния коефициент на биоконцентрация (BCF_K) въз основа на данните, получени при изследването чрез хранителния режим (както е обсъдено в допълнение 8, но този подход следва да се използва предпазливо. По принцип при този подход се допуска кинетика от първи порядък и са приложими само за определени групи съединения. Малко вероятно е подобни подходи да могат да се прилагат за повърхностноактивни вещества (вж. точка 12).

План за изпитване със сведена до минимум експозиция по воден път с по-малко точки на пробовземане за намаляване броя на животните и/или ресурсите (вж. точка 83 по-долу) следва да се прилага само за веществата, при които има основания да се очаква, че поглъщането и почистването ще следват кинетика от първи порядък (т.е. по принцип нейонизирани органични вещества, вж. точка 88).

V.13-I: ИЗПИТВАНЕ ЗА БИОКОНЦЕНТРАЦИЯ В РИБИ ПРИ ЕКСПОЗИЦИЯ ПО ВОДЕН ПЪТ

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

Изпитването се състои от две фази: фаза на експозиция (поглъщане) и фаза след експозиция (очистване). По време на фазата на поглъщане група риби от един вид се експонират на изпитваното вещество при една или повече избрани концентрации, в зависимост от свойствата на изпитваното вещество

⁽¹⁾ Като цяло, измерените концентрации във водата по време на фазата на поглъщането трябва да бъдат най-малко един порядък над границата на количествено определяне, така че да може да бъде измерен повече от един период на полуразграждане на погълнатото вещество в тялото във фазата на почистването на изследването.

⁽²⁾ Вж. допълнение 1 за определения и мерни единици

▼ M7

(вж. точка 49). След това те се прехвърлят в среда, несъдържаща изпитваното вещество, за фазата на очистиране. Фазата на очистиране е необходима във всички случаи, освен ако поглъщането на веществото по време на фазата на поглъщането е било незначително. Концентрацията на изпитваното вещество във/върху рибата (или определени нейни тъкани) се проследява по време на двете фази на изпитването. Освен експонираната група, една контролна група риби се държи при идентични условия с изключение на отсъствието на изпитвано вещество, за да се отнесат възможните неблагоприятни ефекти, наблюдавани при изпитването за биоконцентрация, към съответната контролна група и да се получат концентрации за изпитваното вещество ⁽¹⁾.

В изпитването по воден път фазата на поглъщане обикновено е с продължителност 28 дни. Продължителността може да се увеличи, ако е необходимо (срв. точка 18), или намали, ако е доказано, че стационарното състояние е постигнато по-рано (вж. допълнение 1, Определения и мерни единици). Предвиждане за дължината на фазата на поглъщането и времето за достигане на стационарното състояние може да се направи на база на уравненията от допълнение 5. След това започва периодът за очистиране, в който рибите вече не са подложени на експозиция на изпитваното вещество, като те се прехвърлят в чист съд със същата среда, но без изпитвано вещество. Където е възможно, коефициентът на биоконцентрация се изчислява за предпочитане както като отношение между концентрацията в рибите (C_f) и концентрацията във водата (C_w) при стационарно състояние (BCF_{SS} ; вж. допълнение 1, определение), така и като кинетичен коефициент на биоконцентрация (BCF_K ; вж. допълнение 1, определения и мерни единици), който се оценява като отношение между константите на скоростта на поглъщане (k_1) и на скоростта на очистиране (k_2), като се допуска кинетика от първи порядък ⁽²⁾.

Ако стационарното състояние не се постигне за 28 дни, или BCF се изчислява, като се използва кинетичният подход (вж. точка 38), или фазата на поглъщане може да бъде удължена. Ако това доведе до прекалено дълга от практическа гледна точка фаза на поглъщане за достигане на стационарно състояние (срв. точки 37 и 38, допълнение 5), кинетичният подход е за предпочитане. Като алтернатива за силно хидрофобни вещества следва да се вземе под внимание извършването на изследване чрез хранителния режим ⁽³⁾, при условие че изпитването чрез хранителния режим е съгласувано с относимата правна рамка.

Константите на скоростта на поглъщането и на очистирането (загубата) (или константите, при които се използват по-сложни модели), коефициентът на биоконцентрация (стационарно състояние и/или кинетичен) и, когато е възможно, доверителните граници на всеки един от тези параметри се изчисляват от модела, който най-добре описва измерените концентрации на изпитваното вещество в рибата и водата (срв. допълнение 5).

Увеличението на масата на рибата по време на изпитването ще доведе до намаляване на концентрацията на изпитваното вещество в рибата, чиято маса нараства (т.нар. понижаване на концентрацията в резултат от растеж), като по този начин ще се подцени кинетичният BCF, ако не бъде коригиран с оглед на растежа (срв. точки 72 и 73).

BCF се основава на общата концентрация в рибата (т.е. концентрация на общо мокро тегло на рибата). За специални цели обаче могат да се използват определени тъкани или органи (например мускули, черен дроб), ако рибата е достатъчно голяма или може да се раздели на ядивна част (филе) и неядивна част (вътрешности). Тъй като при много органични вещества има ясна връзка между потенциала за биоконцентрация и хидрофобността, има също и съответна връзка между липидното съдържание в изпитваните риби и наблюдаваната биоконцентрация на такива вещества.

⁽¹⁾ За повечето изпитвани вещества в идеалния случай не следва да има откриване в контролата на вода. Фонови концентрации могат да са относими само за естествени материали (напр. някои метали) и вещества, които са разпространени в околната среда.

⁽²⁾ Ако кинетиката от първи порядък очевидно не е в сила, следва да се прилагат по-сложни модели (вж. позоваванията в допълнение 5) и се търси консултация от статистик в областта на биологията.

⁽³⁾ Поглъщането може да бъде ограничено от ниски концентрации при експозиция поради малка разтворимост във вода в изпитването за биоконцентрация, докато при експозицията чрез хранителния режим могат да се достигнат много по-високи концентрации.

▼ M7

Следователно, за да се намали този източник на вариране в резултатите от изпитването за веществата с висока липофилност (т.е. с $\log K_{OW} > 3$), биоконцентрацията следва да се изразява като нормализирана към риба с 5 % съдържание на липиди (въз основа на мокрото тегло на цялото тяло) в допълнение към тази, изведена пряко от изследването. Това е необходимо, за да се осигури база, от която резултатите за различните вещества и/или изпитвани видове да могат да бъдат сравнявани едни с други. Стойността от 5 % съдържание на липиди се използва широко, тъй като това представлява средната стойност на липидното съдържание на рибите, които обикновено се използват в този метод за изпитване (21).

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

В допълнение към свойствата на изпитваното вещество, дадени във Въведението (точка 3), друга необходима информация е токсичността по отношение на вида риба, която ще се използва в изпитването, за предпочитане асимптотичната LC_{50} (т.е. независима по време) и/или токсичността, прогнозирана от дългосрочни изпитвания на риби (напр. МИ В.47 (22), В.15 (23) и В.14 (24)).

Следва да е наличен подходящ аналитичен метод, с позната точност, прецизност и чувствителност, за количественото определяне на веществото в изпитваните разтвори и в биологичен материал, заедно с подробности за подготовката на пробата и нейното съхранение. Трябва също да се познава аналитичната граница на количествено определяне за изпитваното вещество както във вода, така и в рибните тъкани. Когато се използва изотопно белязано изпитвано вещество, то трябва да е с най-висока чистота (например за предпочитане $> 98\%$) и трябва да се знае процентът радиоактивност, свързан с очистванията.

ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

За да бъде тестът валиден, се прилагат следните условия:

Варирането на температурата на водата е по-малко от $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, тъй като големите отклонения могат да засегнат биологичните параметри, относими към поглъщането и очистването, както и да причинят стрес на животните;

Концентрацията на разтворения кислород не пада под 60 % от стойността на насищане;

Концентрацията на изпитваното вещество в камерите се поддържа в рамките на $\pm 20\%$ от средното на измерените стойности по време на фазата на поглъщане;

Концентрацията на изпитваното вещество е под неговата граница на разтворимост във вода, като се има предвид ефектът, който водата за изпитване може да окаже върху действителната разтворимост⁽¹⁾;

смъртността или други неблагоприятни ефекти/болести както в контролната, така и в третираната риба, е по-малка от 10 % в края на изпитването; когато изпитването продължи повече от няколко седмици или месеци, смъртността или други неблагоприятни ефекти в двата набора риба следва да е по-малка от 5 % за месец и да не превишава общо 30 %. Значими различия в средния растеж между изпитваните и контролните групи, включени в пробовзетите риби, могат да са показател за токсично въздействие на изпитваното вещество.

РЕФЕРЕНТНИ ВЕЩЕСТВА

Използването на референтни вещества с известен потенциал за биоконцентрация и слаб метаболизъм би било полезно при проверката на опитната процедура, когато се изисква (например когато дадена лаборатория не разполага с предишен опит с изпитването, или опитните условия са изменени).

⁽¹⁾ За вещества с повече съставки, UVCB и смеси, за определяне на подходящите концентрации на експозиция следва да се вземе предвид разтворимостта във вода на всяка относима съставка.

▼ **M7****ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА****Апаратура**

Трябва внимателно да се избягва използването на материали — за всички части от оборудването — които могат да се разтворят, абсорбират или изтекат и да окажат неблагоприятен ефект върху рибата. Могат да се използват стандартни правоъгълни или цилиндрични съдове, изработени от химически инертен материал, с подходящ обем спрямо скоростта на разреждане (срв. точка 43). Използването на тръби от мека пластмаса следва да се ограничи до минимум. Следва да бъдат използвани тръби от политетрафлуороетилен, неръждаема стомана и/или стъкло. Опитът показва, че за изпитвани вещества с висок коефициент на адсорбция, като синтетични пиретроиди например, може да се изисква използването на силанизирани стъкла. В такива ситуации оборудването трябва да се изхвърли след употреба. За предпочитане е системите за изпитване да се експонират на концентрации на изпитваното вещество, които ще се използват при изпитването, докато се изисква, за да се докаже поддържането на стабилни концентрации на експозиция преди въвеждането на изпитваните организми.

Вода

Обикновено в изпитването се използва натурална вода, която следва да се взема от незамърсен източник с еднородно качество на водата. При все това, възстановената вода (т.е. деминерализирана вода със специфични хранителни елементи, добавени в известни количества) може да е подходяща, за да се гарантира еднородно качество с течение на времето. Водата за разреждане, която е вода, смесена с изпитваното вещество преди постъпването им в съда за изпитване (срв. точка 30), следва да бъде с качество, което да позволява преживяването на избрания вид риба за периодите на аклиматизация и изпитване, без те да показват необичаен външен вид или поведение. В идеалния случай трябва да се докаже, че изпитваният вид може да преживее, да расте и да се възпроизвежда във водата за разреждане (например в лабораторна култура или изпитване за токсичност през целия жизнен цикъл). Водата за разреждане трябва да се характеризира поне чрез рН, твърдост, общо съдържание на твърди частици, общо съдържание на органичен въглерод (ТОС⁽¹⁾) и, за предпочитане, амониеви йони, нитрити и алкалност, а за морските видове — и соленост. Параметрите, които са важни за оптималното физическо състояние на рибите, не са напълно известни, но в допълнение 2 се дават препоръчителните максимални концентрации за определен брой параметри за сладководна и морска вода за изпитване.

Водата за разреждане трябва да има постоянно качество по време на целия период на изпитването. Нейният рН трябва да е в границите от 6,0 до 8,5 в началото на изпитването, но по време на дадено изпитване той трябва да е в обхват $\pm 0,5$ рН единици. С цел да се гарантира, че водата за разреждане няма да повлияе прекомерно върху резултата от изпитването (например чрез образуване на комплексни съединения с изпитваното вещество) или да окаже неблагоприятно въздействие върху характеристиките на изходния запас от риби, трябва да се вземат проби за анализ на определени интервали, най-малко в началото и в края на изпитването. Прави се определяне на тежки метали (например Cu, Pb, Zn, Hg, Cd и Ni), основни аниони и катиони (например Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻ и SO₄²⁻), пестициди (например общо органофосфорни и общо органохлорни пестициди), общ органичен въглерод и суспендирани частици, например на всеки три месеца, за които се знае, че водата за разреждане има относително постоянно качество. Ако е доказано, че качеството на водата за разреждане е постоянно поне за период от една година, определянията могат да се правят по-рядко и да се увеличат интервалите (например на всеки шест месеца).

Съдържанието на природни частици, а също и общият органичен въглерод на водата за разреждане трябва да са възможно най-ниски, за да се избегне адсорбция на изпитваното вещество върху органична материя, което може да намали неговата бионаличност и по този начин да доведе до подценяване на BCF. Максимално допустимата стойност е 5 mg/l за твърди частици (сухо вещество, непреминаващо през 0,45 µm филтър) и 2 mg/l за общия органичен въглерод (вж. допълнение 1). Ако е необходимо, водата за

⁽¹⁾ ТОС включва органичен въглерод от частици и разтворен органичен въглерод, т.е. ТОС = РОС + ДОС.

▼ M7

разреждане се филтрува преди употреба. Приносът към съдържанието на органичен въглерод във водата за изпитване от страна на изпитваната риба (екскрети) и от хранителни остатъци трябва да се поддържа на възможно най-ниско равнище (срв. точка 46).

Изпитвани разтвори

Приготвя се изходен разтвор от изпитваното вещество в подходяща концентрация. Той се приготвя за предпочитане чрез просто смесване или разбъркване на изпитваното вещество във водата за разреждане. Алтернатива, която може да бъде подходяща в някои случаи, е използването на система за дозиране с десорбция от твърда фаза. Използването на разтворители и диспергиращи средства (средства за повишаване на разтворимостта) обикновено не се препоръчва (срв. (25)); независимо от това използването на тези материали може да бъде приемливо с оглед на получаване на изходен разтвор с подходяща концентрация, но трябва да се положат всички усилия за свеждане до минимум на използването на тези материали и критичната им мицелна концентрация не трябва да се превишава (ако е относимо). Разтворители, които могат да се използват, са: ацетон, етанол, метанол, диметилформамид и триетиленгликол; диспергиращи средства, които са били използвани, са Tween 80, метилцелулоза 0,01 % и HCO-40. Концентрацията на разтворителя в окончателната среда за изпитване следва да бъде една и съща във всички третирания (т.е. независимо от концентрацията на изпитваното вещество) и следва да не надвишава съответните прагове на токсичност, определени за разтворителя при условията на изпитването. Максималното ниво е концентрация от 100 mg/l (или 0,1 ml/l). Малко вероятно е концентрация на разтворител от 100 mg/l да промени в значителна степен максималната концентрация на разтваряне на изпитваното вещество, която може да се постигне в средата (25). Приносът на разтворителя (заедно с изпитваното вещество) към общия органичен въглерод във водата за изпитване следва да е известен. По време на изпитването концентрацията на общия органичен въглерод в съдовете за изпитването не трябва да превишава концентрацията на органичен въглерод, произхождащ от изпитваното вещество, и на разтворителя или средството за повишаване на разтворимостта⁽¹⁾, ако се използва такова, с повече от 10 mg/l ($\pm 20\%$). Съдържанието на органична материя може да има значително влияние върху количеството свободно разтворено изпитвано вещество при проточен тест за риби, особено за силно липофилните вещества. Твърдофазната микроекстракция (срв. точка 60) може да предостави важна информация за съотношението между свързани и свободно разтворени съединения, от които за последните се допуска, че представляват бионаличната фракция. Концентрацията на изпитваното вещество следва да бъде под границата на разтворимост на изпитваното вещество в средата за изпитването, независимо от използването на разтворител или средство за повишаване на разтворимостта. Трябва да се внимава, когато се използват лесно биоразградими разтворители, тъй като те могат да причинят проблеми с бактериален растеж в проточните изпитвания. Ако не е възможно да се приготви изходен разтвор без употребата на средство за повишаване на разтворимостта, следва да се обмисли целесъобразността на изследване с експозиция по воден път вместо изследване с експозиция чрез хранителния режим.

За проточни тестове се изисква система, която постоянно подава и разрежда изходен разтвор на изпитваното вещество (например система с измерваща помпа, пропорционално разреждащо устройство, сатуратор) или система за дозиране с десорбция от твърда фаза, за подаване на изпитваните концентрации към камерите за изпитване. За предпочитане е да се предвидят дневно поне пет подменяния на обема през всяка камера за изпитване. Проточният метод е за предпочитане, но където това не е възможно (например когато изпитваните организми са подложени на неблагоприятно въздействие), може да се използва полустатична техника, при условие че са удовлетворени критериите за валидност (срв. точка 24). Дебитите на изходните разтвори и водата за разреждане следва да се проверят 48 часа преди изпитването и след това поне веднъж на ден по време на изпитването. В тази проверка се включва определянето на дебита през всяка камера за изпитване и се гарантира, че то не варира с повече от 20 % както в самите камери, така и между камерите.

⁽¹⁾ Макар и като цяло да не се препоръчва, ако е използван разтворител или средство за повишаване на разтворимостта, органичният въглерод с произход от това средство следва да бъде добавен към органичния въглерод от изпитваното вещество за оценка на концентрацията на органичния въглерод в съдовете за изпитване.

▼ **M7****Избор на видове**

Важни критерии при избора на видове са те да са достъпни, да могат да се получат с необходимите размери и да могат да се отглеждат удовлетворително в лабораторни условия. Други критерии за избор на вида риба включват любителското, търговското, екологичното значение, както и сравнимата чувствителност, успешно използване в миналото и т.н. Препоръчаните видове за изпитване са дадени в допълнение 3. Могат да се използват и други видове, но може да се наложи адаптиране на процедурата за изпитване за постигане на подходящи условия на изпитването. В този случай следва да се протоколира основанието за избор на вида и на опитния метод. Като цяло, използването на по-малки видове риби ще съкрати времето за достигане на стационарно състояние, но включването на повече риби (проби) може да е необходимо за адекватен анализ на съдържанието на липиди и концентрациите на изпитваното вещество в рибата. Освен това възможно е различията в скоростите на дишането и метаболизма между младите и по-възрастните риби може да затрудни сравняването на резултатите между различни изпитвания и различни изпитвани видове. Следва да се отбележи, че видовете риби, изпитвани по време на (ювенилен) етап от жизнен цикъл с бърз растеж може да усложни тълкуването на данните.

Отглеждане на рибата (относимо към експозиция по воден път и чрез хранителния режим)

Исходната популация риба следва да бъде аклиматизирана в продължение на поне две седмици във вода (срв. точка 28) при температурата на изпитването и хранена с достатъчен хранителен режим (срв. точка 45). Както водата, така и хранителният режим трябва да са от същия вид като тези, които ще се използват по време на изпитването.

След 48-часов период на свикване се отчита смъртността и се прилагат следните критерии:

- при смъртност над от 10 % от популацията за седем дни: отхвърля се цялата партида;
- при смъртност между 5 и 10 % от популацията за седем дни: аклиматизация за нови седем дни — ако смъртността е повече от 5 % през вторите седем дни: отхвърля се цялата партида;
- при смъртност под 5 % от популацията за седем дни: партидата се приема.

Рибата, която се използва при изпитванията, не трябва да страда от никакви видими болести или отклонения. Всички болни риби трябва да се отстранят. Рибата не трябва да бъде лекувана от болести две седмици преди изпитването или по време на изпитването.

ПРОВЕЖДАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**Предварително изпитване**

Може да е полезно да се извърши предварителен опит с цел да се оптимизират условията на изпитване при окончателното изпитване, например избор на концентрация(и) на изпитваното вещество, продължителност на фазите на поглъщане и очистване, или да се определи дали е необходимо провеждането на цялостно изпитване. Планът за предварителното изпитване следва да бъдат такъв, че да се получи изискваната информация. Той може да бъде разгледан, ако сведено до минимум изпитване може да е достатъчно, за да се получи VCF, или ако е необходимо цялостно изследване (срв. точки 83—95 за сведеното до минимум изпитване).

Условия на експозиция*Продължителност на фазата на поглъщане*

Прогноза за продължителността на фазата на поглъщане може да се направи на базата на практически опит (например, от предходно изследване или от изследване за акумулиране на натрупване на структурно подобно вещество) или от определени емпирични взаимовръзки, използващи познания относно водоразтворимостта или коефициента на разпределение октанол/вода на изпитваното вещество (при условие че поглъщането следва кинетика от първи порядък, срв. допълнение 5).

▼ **M7**

Фазата на поглъщане следва да се провежда 28 дни, освен ако може да се докаже, че стационарното състояние е постигнато по-рано (вж. допълнение 1, определения и мерни единици). Стационарно състояние е достигнато на графиката на изпитваното вещество в рибата (C_f) спрямо времето, когато кривата стане успоредна на времевата ос, и три последователни анализа на C_f , направени върху проби, взети на интервали от поне два дни, не се отличават с повече от $\pm 20\%$ един от друг, и няма значимо увеличение на C_f във времето между първия и последния от последователните анализи. Когато се анализират обединени проби, се изискват поне четири последователни анализа. За изпитвани вещества, които се усвояват бавно, е подходящо интервалите да бъдат по седем дни. Ако стационарното състояние не се постигне за 28 дни, или BCF се изчислява с използване само на кинетичния подход, който не е зависим от достигането на стационарно състояние, или фазата на поглъщане може да се удължи, като се правят допълнителни измервания, или до достигането на стационарно състояние, или с 60 дни, в зависимост от това кое удължение е по-кратко. Също така, концентрацията на изпитваното вещество в рибата на фазата на поглъщане трябва да бъде достатъчно висока, за да се осигури надеждна оценка на k_2 от фазата на почистването. Ако не се установи значимо поглъщане след 28 дни, изпитването може да се прекрати.

Продължителност на фазата на почистването

За веществата, следващи кинетика от първи порядък, период от време, равен на половината от продължителността на фазата на поглъщането обикновено е достатъчен за подходящо (например 95 %) намаляване на погълнатото вещество в тялото на рибата (срв. допълнение 5 за обяснение на оценката). Ако времето, необходимо за да се постигне 95 % загуба, е прекомерно дълго от практична гледна точка, например превишаващо два пъти нормалната продължителност на фазата на поглъщане (т.е. повече от 56 дни), може да се използва по-кратък период (напр. докато концентрацията на изпитваното вещество стане по-малко от 10 % от концентрацията в стационарно състояние). Независимо от това, по-дълги периоди на почистване могат да бъдат необходими за вещества, които имат по-сложни схеми на поглъщане и почистване, отколкото представените чрез модел с риби с един компартмент, който дава кинетика от първи порядък. Ако се наблюдават и/или очакват такива сложни модели, препоръчително е да се търси консултация от статистик в областта на биологията и/или специалист в областта на фармакокинетиката, за да се гарантира правилно планиране на изпитването. При удължаване на периода за почистване броят риби за пробовземане може да стане ограничаващ и различията в растежа между рибите може да повлияе на резултатите. Периодът също ще се регулира чрез периода, през който концентрацията на изпитваното вещество в рибите остава над аналитичната граница на количествено определяне.

Брой на изпитваните риби

Избира се такъв брой риби за концентрация за изпитване, че да има минимум по 4 риби за всяка точка за пробовземане. Рибите следва да бъдат обединени, само ако анализът на една риба не е осъществим. Ако се цели по-голяма прецизност при изглаждането на крива (и производни параметри), или ако се изискват изследвания на метаболизма (например за да се направи разграничение между метаболити и базово вещество при използване на изотопно белязани изпитвани вещества), ще бъдат необходими повече риби за всяка точка за пробовземане. Липидното съдържание следва да се определи върху същия биологичен материал, който се използва за определяне на концентрацията на изпитваното вещество. Ако това не е осъществимо, може да бъдат необходими допълнителни риби (срв. точки 56 и 57).

Ако се използват полово зрели (т.е. достигнали полова зрялост) риби, те не следва преди изпитването или по време на изпитването да са в състояние на хвърляне на хайвер или наскоро да са преминали през това състояние. Следва също да се протоколира дали в опита се използват мъжки риби, женски риби, или риби и от двата пола. Ако се използват риби и от двата пола, следва да се документира, че разликите в растежа и липидното съдържание между половете не са значими преди началото на експозицията, по-специално ако се очаква, че обединяването на мъжки и женски риби ще бъде необходимо за гарантиране на концентрации на веществото и/или съдържание на липиди, които могат да бъдат определени.

▼ M7

За всяко изпитване се избират риби с близко тегло, така че най-малките да не са по-малки от две трети от теглото на най-големите. Рибите трябва да са от един и същи годишен клас и от един и същи източник. Понеже теглото и възрастта на една риба може да окаже значимо влияние върху стойностите на BCF (12), тези подробности се протоколират старателно. Препоръчва се подпроба от изходния рибен запас да се претегли малко преди началото на изпитването, за да се прецени средното тегло (срв. точка 61).

Зареждане

Следва да се използват големи съотношения вода към риба, за да се намали до минимум намаляването на концентрацията на изпитваното съединение във водата, причинено от прибавянето на риба в началото на изпитването, а също и за да се избегне намаляване на концентрацията на разтворения кислород. Важно е скоростта на зареждане да е подходяща спрямо използвания вид за изпитването. При всички случаи обичайно се препоръчва скорост на зареждане риба към вода от 0,1 до 1,0 g риба (мокро тегло) за литър вода на ден. По-високи скорости на зареждане риба към вода могат да се използват, ако се докаже, че изискваната концентрация на изпитваното вещество може да се поддържа в рамките на $\pm 20\%$ и че концентрацията на разтворения кислород не пада под 60 % от стойността на насищане.

При подбора на подходящи режими на зареждане се взема предвид нормалното местообитание на вида риба. Например дънните риби може да изискват повече място на дъното на аквариума за същия обем вода в сравнение с пелагичните рибни видове.

Хранене

По време на периодите на аклиматизация и изпитване хранителният режим на рибата е на база познато съдържание на липиди и общ белтък при количество, достатъчно да я поддържа здрава и да запазва теглото (допуска се известен растеж). По време на периодите на аклиматизация и изпитване храненето е ежедневно, на определено равнище в зависимост от използвания вид, опитните условия и енергийната стойност на храната (например за дъгова пъстърва е приблизително между 1 и 2 % от телесното тегло на ден). Скоростта на храненето следва да се избира така, че да се избягват бърз растеж и голямо увеличение на липидното съдържание. При необходимост количеството храна се преизчислява, например веднъж седмично, с оглед запазване на същата скорост на храненето. За целите на това изчисление теглото на рибата във всяка камера за изпитване се оценява на база на теглото на последно пробовзетата риба в тази камера. Рибата, останала в камерата, не се претегля.

Неконсумираната храна и изпражненията следва да се източват ежедневно от камерите за изпитване, малко след храненето (30 минути до един час). Камерите се поддържат колкото е възможно най-чисти по време на изпитването, така че концентрацията на органична материя да е възможно най-ниска (срв. точка 29), тъй като присъствието на органичен въглерод може да ограничи бионаличността на изпитваното вещество (12).

Понеже много от фуражите са получени от рибно месо, следва да се гарантира, че фуражът няма да окаже въздействие върху резултатите от изпитването или да предизвика неблагоприятни въздействия, напр. чрез съдържание на (следи от) пестициди, на тежки метали и/или на самото изпитвано вещество.

Светлина и температура

Препоръчва се от 12 до 16 часа излагане на светлина в денонощието, а температурата ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) трябва да е подходяща за изпитвания вид (срв. допълнение 3). Типът и характеристиките на осветлението трябва да са познати. Трябва да се внимава относно възможната фототрансформация на изпитваното вещество при условията на облъчване на изследването. Използва се подходящо осветление, за да се избегне експозиция на рибата на неестествени фотопродукти. В някои случаи може да е подходяща употребата на екран, ограничаващ ултравиолетовите излъчвания под 290 nm.

▼ M7*Концентрации на изпитване*

Изпитването първоначално е било планирано за неполярни органични вещества. За този тип вещество експозицията на рибата на единична концентрация се очаква да бъде достатъчна, тъй като не се очаква въздействие от концентрацията, въпреки че могат да бъдат необходими две концентрации за съответната правна рамка. Ако се изпитват вещества извън тази област, или са известни други признаци за възможна зависимост от концентрацията, изпитването трябва да се проведе с две или повече концентрации. Ако се изпитва само една концентрация, следва да бъде предоставена обосновка за използването на една концентрация (срв. точка 79). Също така, изпитваната концентрация следва да бъде толкова ниска, колкото е практически или технически възможно (т.е. да не е близо до границата на разтворимост).

В някои случаи може да се очаква, че биоконцентрацията на веществото зависи от водната концентрация (напр. за метали, при които поглъщането от рибите може да бъде поне частично регулирано). В такъв случай е необходимо изпитване на поне две, а за предпочитане повече концентрации (срв. точка 49), които са относими към околната среда. Също така за вещества, за които изпитваните концентрации трябва да бъдат в близост до границата на разтворимост по практически причини, се препоръчва изпитване на минимум две концентрации, тъй като това може да даде представа за надеждността на концентрациите на експозиция. Изборът на концентрации на изпитване следва да включва реалистичната концентрация от екологична гледна точка, както и концентрацията, която е относима към целта на специфичната оценка.

Концентрацията (концентрациите) на изпитваното вещество следва да бъдат избрани под неговото равнище на хроничните ефекти, или 1 % от острата му асимптотична LC_{50} , в рамките на обхват, относим към околната среда, и поне един порядък над неговата граница на количествено определяне във вода чрез използвания метод за анализ. Най-високата допустима концентрация за изпитване може също да бъде определена чрез разделяне на острата $96\text{ h } LC_{50}$ на подходящо отношение остра/хронична (напр. подходящи отношения за някои вещества са около три, но някои са над 100). Ако се използва втора концентрация, тя следва да се различава от тази над нея не е кратност десет. Ако това не е възможно поради критерия за токсичност (който ограничава най-горната концентрация за изпитване) и аналитичната граница (който ограничава най-ниската концентрация за изпитване), може да се използва кратност под десет, и трябва да бъде взето под внимание използване на изотопно белязано вещество (с най-голямата чистота, напр. за предпочитане > 98 %). Трябва да се внимава нито една от използваните концентрации да не е над границата на разтворимост на изпитваното вещество в изпитвателната среда.

Контроли

Една контрола с вода за разреждане или, ако е относимо (срв. точки 30 и 31), една контрола, съдържаща разтворител, следва да бъде изпитана в допълнение към изпитваните серии.

Честота на измерванията на качеството на водата

По време на изпитването разтвореният кислород, ТОС, рН и температурата следва да се измерват във всички съдове за изпитване и в съдовете с контроли. Общата твърдост и соленост (ако е относимо) се измерват в контролата (контролите) и в един съд. Ако се изпитват две или повече концентрации, измерват се тези параметри, които са с по-висока (или с най-високата) концентрация. Като минимум разтвореният кислород и солеността (ако е относимо) следва да се измерят три пъти — в началото, около средата и в края на периода на поглъщане — и веднъж седмично в периода на почистване. ТОС следва да се измерва в началото на изпитването (24 часа и 48 часа преди началото на изпитването във фазата на поглъщане) преди добавянето на рибата и най-малко веднъж седмично по време както на фазата на поглъщане, така и на фазата на почистване. Температурата следва да се измерва ежедневно, рН — в началото и края на всеки период, а твърдостта — веднъж за всяко изпитване. Желателно е температурата да се контролира непрекъснато поне в един съд.

▼ **M7****Пробовземане и анализ на рибата и водата***График за пробовземане на рибата и водата*

Проба от водата от камерите за изпитване за определяне на концентрацията на изпитваното вещество се взема преди добавянето на рибата и по време както на фазата на поглъщане, така и на фазата на почистване. Водата трябва да се пробовзема преди хранене, едновременно с пробовземането на рибата. За осигуряване на стабилни концентрации след въвеждането на рибата може да бъде полезно по-често вземане на проби. Концентрациите на изпитваното вещество следва да бъдат определени по време на фазата на поглъщане, за да се провери съответствието с критериите за валидност (точка 24). Ако анализите на водните проби в началото на фазата на почистването показват, че изпитваното вещество не се открива, това може да се използва като обосновка да не се измерва водата за изпитването и контролата на вода за изпитваното вещество за останалата част от фазата на почистването.

Рибите следва да бъдат пробовзети най-малко пет пъти през фазата на поглъщане и поне четири пъти през фазата на почистване за изпитваното вещество. Тъй като при някои случаи ще бъде трудно да се пресметне една сравнително точна оценка на стойността на BCF на база на този брой на пробите (особено когато има показания за кинетика, различна от обикновеното поглъщане от първи порядък, или от кинетиката на почистването), може би е препоръчително да се вземат проби по-често и в двата периода (срв. допълнение 4).

Липидното съдържание се определя върху същия биологичен материал, който се използва за определяне на концентрацията на изпитваното вещество, поне в началото и в края на фазата на поглъщане и в края на фазата на почистване. Ако това не е осъществимо, следва да се вземат проби от поне три отделни риби, за да се определи съдържанието на липиди за всяка от еднаквите три времеви точки. Броят на рибите за съд в началото на опита следва да бъде съответно коригиран ⁽¹⁾. Като алтернатива, ако не бъдат открити значими количества от изпитваното вещество в контролните риби (т.е. рибите от изходната популация), контролните риби от изпитването могат да се анализират само за липидно съдържание, а анализът на изпитваното вещество в изпитваната група (групи) (и свързаните с това стойности на константата на скоростта на поглъщане, константата на скоростта на почистване и BCF) може да се коригира за промени в зависимост от липидното съдържание в контролната група по време на изпитването ⁽²⁾.

Мъртвите или болните риби не следва да се анализират за изпитваното вещество или за концентрацията на липиди.

Пример за приемлив график за пробовземане е даден в допълнение 4. Лесно могат да се изчислят и други графици, с помощта на други допускания за стойности на K_{OW} , за да се изчисли времето за експозиция за 95 % поглъщане (вж. допълнение 5 за изчисления).

Вземането на проби следва да продължи по време на фазата на поглъщане, докато се установи стационарно състояние (вж. допълнение 1, Определения и мерни единици) или до прекратяването по друг начин на фазата на поглъщане (след 28 или 60 дни, срв. точки 37 и 38). Преди началото на фазата на почистването рибата следва да се прехвърли в чисти съдове.

Пробовземане и приготвяне на пробите

Следва да се получат водни проби за анализ, например чрез източване през инертни тръбички от централна точка в камерата за изпитване. Както изглежда, нито филтруването, нито центрофугирането разделят винаги

⁽¹⁾ Ако съдържанието на липиди не е анализирано в същата риба, в която е анализирано изпитваното вещество, рибата следва най-малкото да бъде със сходно тегло и (ако е относимо) — от същия пол.

⁽²⁾ Тази алтернатива е валидна само ако рибите във всички изпитвани групи се държат в групи със сходни размери, ако рибите се отстраняват по един и същ модел и ако бъдат хранени по един и същ начин. Това гарантира, че растежът на рибите във всички групи на изпитване е сходен, ако изпитваната концентрация е по-ниска от токсичния обхват. Ако растежът е сходен, очаква се липидното съдържание също да е сходно. Различен растеж в контролата показва евентуално въздействие от страна на веществото и евентуално прави изследването невалидно.

▼ M7

фракцията от изпитваното вещество, която не е бионалична, от бионаличната фракция. Ако се прилага техника на разделяне, с оглед на трудността, свързани с бионаличността, в протокола от изпитването следва винаги да се представя обосновка за техниката за разделянето или валидиране на тази техника (25). Особено за силно хидрофобни вещества (т.е. вещества с $\log K_{OW} > 5$) (12) (26), при които може да се получи адсорбция върху филтърната матрица или съдовете за центрофугиране, пробите следва да не се подлагат на тези третираня. Вместо това следва да се вземат мерки за поддържане на съдовете възможно най-чисти (срв. точка 46) и общото съдържание на органичен въглерод следва да се контролира и през двете фази — на поглъщане и на очистиране (срв. точка 53). С цел да се избегнат евентуалните проблеми с намалената бионаличност, за малко разтворими и силно хидрофобни вещества за пробовземане могат да се използват техники с твърдофазна микроекстракция.

Пробовзетите риби следва да бъдат незабавно умъртвени чрез най-подходящия и хуманен метод (за измервания на цяла риба следва да не се извършват други процедури освен изплакване с вода (вж. точка 28) и изсушаване на рибата с помощта на попивателна хартия). Извършва се претегляне и измерване на цялата дължина⁽¹⁾. Измереното тегло и дължината на всяка отделна риба следва да бъдат свързани с концентрацията на анализирания материал (и липидно съдържание, ако е приложимо), например с помощта на уникален идентификационен код за всяка пробовзета риба.

Желателно е рибата и водата да се анализират веднага след пробовземането, с цел да се избегне разграждането или други загуби, и да се изчислят приблизителни константи на скоростите на поглъщане и на очистиране, докато продължава изпитването. Незабавните анализи също така избягват закъснението при определяне на достигането на плато (стационарно състояние).

Ако не се извършат незабавни анализи, пробите следва да се съхраняват чрез подходящ метод. Преди началото на изследването следва да бъде получена информация относно подходящия метод за съхранение на конкретното изпитвано вещество — например дълбоко замразяване, съхранение при 4 °C, извличане и др. Продължителността на съхраняването трябва да бъде избрана така, че да се гарантира, че веществото не се е разградило по време на съхранението.

Качество на метода за анализ

Понеже цялата процедура се обуславя по същество от точността, прецизността и чувствителността на метода за анализ, използван за изпитването, се проверява опитно дали точността, прецизността и възпроизводимостта на анализа на веществото, а също и аналитичният добив на изпитваното вещество от водата и рибата са задоволителни за конкретния метод. Това следва да бъде част от предварителните изпитвания. Също така се проверява дали изпитваното вещество не е откриваемо в използваната вода за разреждане. Ако е необходимо, коригират се стойностите на концентрацията на изпитваното вещество във водата и рибата, получени при изпитването за стойностите на аналитичния добив и фоновите стойности на контролите. С пробите вода и риба следва да се борави по начин, който намалява до минимум замърсяването и загубите (които, например, могат да се получат при адсорбция върху устройството за вземане на проба).

Анализ на проби риба

Ако при изпитването се използват изотопно белязани материали, може да се анализира общото количество изотопно белязани материали (т.е. базово вещество и метаболити) или пробите може да се почистят така, че базовото съединение да може да се анализира отделно. Ако BCF следва да се основава на базовото вещество, като минимум основните метаболити следва да се характеризират в края на фазата на поглъщане (вж. точка 6). Главните метаболити са онези, които са $\geq 10\%$ от общите остатъци в рибните тъкани, онези, които са $\geq 5\%$ при две последователни точки за вземане на проби, онези, които показват нарастващи нива по време на фазата на поглъщане, и онези, за които е известно, че представляват токсикологичен проблем. Ако BCF за цялата риба по отношение на общите

⁽¹⁾ В допълнение към теглото следва да бъде записана общата дължина, тъй като сравнението на степента на нарастване на дължината по време на изпитването е добър показател за това дали е настъпило неблагоприятно въздействие.

▼ **M7**

изотопно белязани остатъци е ≥ 500 , може би е препоръчително, а за някои категории вещества като пестицидите е силно препоръчително, да се идентифицират и количествено да се определят главните метаболити. Количественото определяне на такива метаболити може да се изисква от някои регулаторни органи. Ако продуктите на разграждането, представляващи $\geq 10\%$ от общите изотопно белязани остатъци в рибните тъкани, са идентифицирани и определени количествено, тогава се препоръчва да се направи същото и за продуктите на разграждането във водата за изпитване. Ако не е осъществимо, това трябва да бъде обяснено в протокола.

Концентрацията на изпитваното вещество обикновено следва да се определя за всяка отделна претеглена риба. Ако това не е възможно, може да се направи обединяване на пробите при всеки случай на пробовземане, но обединяването силно ограничава статистическите процедури, които могат да се приложат към данните, така че за да се пригледят желаното обединяване, статистическата процедура и мощността, в изпитването следва да бъдат включени достатъчен брой риби. Позовавания (27) и (28) могат да се използват като въведение към относимите процедури по обединяване.

BCF следва да се изразява и като нормализирана към риба с 5% съдържание на липиди (въз основа на мокро тегло), в допълнение към изразяването, получено пряко при изследването (вж. точка 21), освен ако може да се аргументира, че изпитваното вещество не се акумулира главно в липиди. Липидното съдържание на рибата следва да се определя при всяко вземане на проба, когато е възможно, за предпочитане от същия екстракт като този, получен за анализа за изпитваното вещество, понеже липидите често трябва да се отстраняват от екстракта, преди той да може да бъде анализиран хроматографски. Независимо от това, анализът на изпитваните вещества често изисква специфични процедури за екстракция, които може да са в противоречие с методите за изпитване за определяне на липиди. В този случай (докато не се появят подходящи безразрушителни инструментални методи) се препоръчва използване на различна стратегия за определяне на липидното съдържание на рибата (вж. точка 56). За определянето на съдържанието на липиди следва да се използват подходящи методи (20). Техниката на екстракция с хлороформ/метанол (29) може да се препоръча като стандартен метод (30), но методът на Smedes (31) се препоръчва като алтернативна техника. Последният метод се характеризира със съпоставима ефикасност на извличането, висока точност, използване на органични разтворители, които са по-малко токсични, и удобно изпълнение. Могат да бъдат използвани други методи, за които точността е в благоприятно положение по отношение на препоръчителните методи, ако това е надлежно обосновано. Важно е да се дадат подробности за използвания метод.

Измерване на растежа на рибите

В началото на изпитването е необходимо да бъдат претеглени индивидуално пет до десет риби от изходната популация, и да бъде измерена тяхната обща дължина. Това могат да бъдат същите риби, които се използват за анализа на липиди (вж. точка 56). Теглото и дължината на рибите, използвани за всяко пробовземане от изпитваните и контролните групи, следва да се измерят преди извършването на химичен анализ или на анализ на липиди. Измерванията на тези риби могат да се използват за оценка на теглото и дължината на рибите, останали в изпитваните и контролните съдове (вж. точка 45).

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Обработка на резултатите

Кривата на поглъщането на изпитваното вещество следва да се получи чрез начертане на неговата концентрация във/върху рибата (или определени тъкани) във фазата на поглъщането спрямо времето в аритметични скали. Ако кривата е достигнала плато, т.е. стане приблизително асимптотична към времевата ос, BCF при стационарно състояние (BCF_{SS}) следва да се изчисли от:

$$\frac{C_f \text{ при стационарно състояние (средна)}}{C_w \text{ при стационарно състояние (средна)}}$$

▼ M7

Развитието на C_f може да бъде повлияно от растежа на рибите (вж. точки 72 и 73). Средната концентрация на експозиция (C_w) се влияе от варирането във времето. Може да се очаква, че средно претеглената във времето концентрация е по-подходяща и точна за изследванията за биоаккумуляция, дори ако варирането е в рамките на съответния обхват на валидност (вж. точка 24). Средно претеглената във времето (TWA) концентрация във вода може да се изчисли съгласно допълнение 5, раздел 1.

Кинетичният коефициент на биоконцентрация (BCF_K) следва да се определя като съотношение k_1/k_2 , двете скоростни константи при кинетика от първи порядък. Скоростните константи k_1 и k_2 , и BCF_K могат да бъдат получени чрез едновременно изглаждане както на фазата на поглъщане, така и на фазата на очистиране. Като алтернатива, k_1 и k_2 могат да се определят последователно (вж. допълнение 5 за описание и сравнение на тези методи). Константата на скоростта на очистиране (k_2) може да се нуждае от корекция за понижаване на концентрацията в резултат от растеж (вж. точки 72 и 73). Ако кривата на поглъщането и/или на очистирането очевидно не е от първи порядък, следва да се прилагат по-сложни модели (вж. позоваванията в приложение 5) и следва да се потърси консултация от статистик в областта на биологията и/или специалист в областта на фармакокинетиката.

Данни за теглото/обема на рибите

Мокрото тегло и общата дължина на всички отделни риби за всички интервали на пробовземане са представени в табличен вид отделно за изпитваните и контролните групи по време на фазата на поглъщане (включително изходната популация за стартиране на поглъщането) и на фазата на очистиране. Измереното тегло и дължината на всяка отделна риба следва да бъдат свързани с анализираната химична концентрация, например с помощта на уникален идентификационен код за всяка пробовзета риба. Теглото е предпочитаният измерител за растежа за целите на коригирането на стойностите на кинетичния BCF за понижаване на концентрацията в резултат от растеж (вж. точка 73 и допълнение 5 за метода, използван за коригиране на данни за понижаване на концентрацията в резултат от растеж).

Коригиране за понижаване на концентрацията в резултат от растеж и нормализиране за липиди

Растежът на рибите по време на фазата на очистиране може да намали измерените химични концентрации в рибата, в резултат на което общата константа на скоростта на очистирането (k_2) е по-голяма, отколкото би била само поради процесите на отстраняване (напр. дишане, метаболизъм, дефекация). Кинетичните коефициенти на биоконцентрация следва да бъдат коригирани за понижаване на концентрацията в резултат от растеж. BCF_{SS} също се влияе от растежа, но няма одобрена процедура за коригиране на BCF_{SS} за растеж. В случаи на значителен растеж следва също така да бъде получен BCF_K , коригиран за растеж (BCF_{Kg}), тъй като е възможно да е относителен измерител на коефициента на биоконцентрация. Липидното съдържание на изпитваните риби (което е силно свързано с биоаккумуляцията на хидрофобни вещества) на практика може да варира в достатъчна степен, така че е необходима нормализация за определяне на липидното съдържание в риби (5 % w/w), за да се представи по смислен начин както кинетичният коефициент на биоконцентрация, така и коефициентът на биоконцентрация в стационарно състояние, освен ако може да се аргументира, че изпитваното вещество не се натрупва основно в липиди (напр. някои напълно флуорирани вещества могат да се свързват с белтъци). Уравнения и примери за тези изчисления могат да бъдат намерени в допълнение 5.

За коригирането на стойностите на кинетичния BCF за понижаване на концентрацията в резултат от растеж, константата на скоростта на очистиране трябва да се коригира за растеж. Тази коригирана за растеж константа на скоростта на очистиране (k_{2g}) се изчислява чрез изваждане на константата на скоростта на растежа (k_g , получена от данните за измереното тегло) от общата константа на скоростта на очистирането (k_2). След това коригираният за растеж кинетичен коефициент на биоконцентрация се изчислява, като се раздели константата на скоростта на поглъщане (k_1) на коригираната за растеж константа на скоростта на очистиране (k_{2g}) (вж. допълнение 5). В някои случаи този подход е изложен на риск. Например, за вещества с много бавно очистиране, изпитвани в бързорастящи риби, получената k_{2g} може да е много малка и по този начин грешката в

▼ **M7**

двете скоростни константи, използвани за нейното получаване, придобива изключително значение и в някои оценките за k_g могат да бъдат по-големи от k_2 . Алтернативен подход, който заобикаля необходимостта от коригиране за понижаване на концентрацията в резултат от растеж, включва използване на масата на изпитваното вещество за риба (на база цяла риба) при почистването, вместо обичайната маса на изпитваното вещество за единица тегло на рибата (концентрация). Това може лесно да бъде постигнато, тъй като настоящият метод за изпитване (МИ) следва да свързва записаните тъканни концентрации с теглата на отделните риби. Обикновената процедурата за това е очертана в допълнение 5. Следва да се отбележи, че k_2 все пак следва да се протоколира, независимо че се използва този алтернативен подход.

Кинетичният коефициент на биоконцентрация и коефициентът на биоконцентрация в стационарно състояние следва също да бъдат протоколирани по отношение на стойност на липидно съдържание на рибата по подразбиране 5 % (тегло/тегло), освен ако може да се аргументира, че изпитваното вещество не се натрупва основно в липиди. Данните за концентрация в риби, или BCF, се нормализират според съотношението между 5 % и действителното (индивидуално) средно липидно съдържание (в % мокро тегло) (вж. допълнение 5).

Ако върху една и съща риба са извършени химичен анализ и на анализ на липиди, тогава за изчисляване на нормализиран за липиди BCF следва да се използват нормализирани за липиди за отделната риба. Като алтернатива, ако растежът при подложените на експозиция и контролните риби е подобен, за корекция на липидите може да бъде използвано само липидното съдържание на контролните риби (вж. точка 56). Метод за изчисляване на нормализиран за липиди BCF е описан в допълнение 5.

Тълкуване на резултатите

Резултатите трябва да се тълкуват с внимание, когато измерените концентрации на изпитваните разтвори са на нива, близки до границата на откриване на метода за анализ.

Средният растеж както в изпитваните, така и в контролните групи следва по принцип да не се различава значимо, за да се изключат токсични ефекти. Константите на скоростта на растеж или кривите на растежа от двете групи следва да бъдат сравнени с подходяща процедура⁽¹⁾).

Ясно определените криви на поглъщане и на почистване са показател за биоконцентрационни данни с добро качество. За скоростните константи резултат от χ^2 -тест за качество на приближението следва да показва добра пригодност (т.е. малък процент на грешка от измерване (32)) за модела на биоаккумуляция, така че константите на скоростта могат да се считат за надеждни (вж. допълнение 5). Ако се използва повече от една концентрация за изпитване, варирането в константите за поглъщане/почистване между изпитваните концентрации трябва да бъдат по-малки от 20 %⁽²⁾. В противен случай може да се посочи зависимостта от концентрацията. Наблюдаваните значими разлики в константите на скоростите при поглъщане/почистване между приложените изпитвани концентрации трябва да се отчетат и да се дадат възможни обяснения. Обикновено 95 % доверителна граница на BCF при добре планирани изследвания доближава ± 20 % от получените стойности на BCF.

Ако се изпитват две или повече концентрации, резултатите от двете или от всички концентрации се използват, за да проучи дали резултатите са

⁽¹⁾ Може да се извърши *t*-тест за константите на скоростта на растеж, с цел да се тества дали се различава растежът между контролните и изпитваните групи, или *F*-тест в случай на анализ на дисперсията. Ако е необходимо може да се използва *F*-тест или тест за правдоподобно отношение за подпомагане при избора на подходящия модел на растеж (ОИСП монография 54, (32)).

⁽²⁾ Тези проценти допускат, че методите за анализ са надеждни и че полуразграждането е < 14 дни. Ако методите за анализ са по-малко надеждни, или полуразграждането е (значително) увеличено, тези стойности ще бъдат по-големи.

▼ **M7**

съвместими, и да се провери дали е налице зависимост от концентрацията. Ако с цел намаляване на използването на животни и/или ресурси се изпитва само една концентрация, следва да бъде предоставена обосновка за използването на една концентрация.

Полученият BCF_{SS} е под въпрос, ако BCF_K е значително по-голям от BCF_{SS} , тъй като това може да е показател че не е достигнато стационарно състояние, или че не са били взети под внимание процесите на понижаване на концентрацията в резултат от растеж и на загубата. В случаите, когато BCF_{SS} е много по-голям от BCF_K , получаването на константите на скоростта на поглъщане и на очистване следва да бъде проверено за грешки и подложено на повторна оценка. Различна процедура за изглаждане може да подобри оценката на BCF_K (вж. допълнение 5).

Протокол от изпитването

Освен информацията за изпитваното вещество, посочена в точка 3, протоколът от изпитването включва следната информация:

Изпитвано вещество:

физична природа и, където е относимо, физични и химични свойства;

— данни за химична идентификация, като наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, SMILES или InChI код, структурна формула, чистота, химическа идентичност на онечистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и др. (включително съдържание на органичен въглерод, ако е уместно).

— За вещества с повече съставки и UVCB (химични вещества с непознат или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали) описание, доколкото е възможно, на химичната идентичност на отделните съставки и — за всяка от тях — нейното процентно съдържание в общата маса на веществото. Следва да се обобщи как методът за анализ, използван при изпитването, позволява измерването на концентрацията на веществото; трябва да бъдат описани всички аналитични процедури, включително точността на метода, границата на откриване на метода и границата на количествено определяне.

— Ако е изотопно белязано, точното положение на белязания атом (атоми) и процент на радиоактивността, свързана с онечистванията.

— Информация относно токсичността на изпитваното вещество за рибите (в идеалния случай за изпитвания вид риба). Токсичността следва да бъде протоколирана като остра 96 h LC_{50} и NOAEC и LOAEC от хронично изследване (т.е. изпитване за ранен стадий от жизнения цикъл или изпитване за целия жизнен цикъл, ако са налични).

— Условия на съхранение на изпитвания химикал или на изпитваното вещество и стабилност на изпитвания химикал или на изпитваното вещество при условията на съхранение, ако се съхранява преди употреба.

Изпитван вид:

научно наименование, порода, източник, всякаква предварителна обработка, аклиматизация, възраст, пол (ако е относимо), обхват на размерите (тегло и дължина) и др.

Условия на изпитването:

— използвана процедура за изпитване (например проточна или полустатична); редовно изследване или изследване със сведен до минимум план (включително обяснение и обосновка).

— Тип и характеристики на използваното осветление и фотопериода(ите).

— План на изпитването (например брой и размер на камерите за изпитване, скорост на подмяна на обема вода, скорост на зареждане, брой на повторенията, брой риби на повторение, брой на изпитваните концентрации, продължителност на фазите на поглъщане и на очистване, честота на вземане на проби от риба и вода),

▼ M7

- Метод на приготвяне на изходни разтвори и честота на подновяване (разтворителят, неговата концентрация и приноса му към съдържанието на органичен въглерод във водата за изпитване трябва да се посочат, когато се използва) или описание на алтернативна система за дозиране.
- Номиналните изпитвани концентрации, средните величини на измерваните стойности и техните стандартни отклонения в съдовете за изпитване и методът, по който са получени и честотата, с която се изчисляват.
- Източник на вода за разреждане, описание на всякаква предварителна обработка, резултати от всякакво доказване на способността на изпитваната риба да живее във водата и характеристики на водата: рН, твърдост, температура, концентрация на разтворен кислород, остатъчни нива на хлор (ако се измерват), общо съдържание на органичен въглерод, суспендирани твърди частици, соленост на средата за изпитване (ако е уместно) и всякакви други направени измервания.
- Качество на водата в съдовете за изпитване, рН, твърдост, ТОС, температура и концентрация на разтворен кислород; използвани методи и честота на измерванията.
- Подробна информация за храненето, например тип на храната (храните), източник, състав (поне съдържание на липиди и белтъци, ако е възможно), избрана скорост на хранене, дадено количество и с каква честота;
- Информация за третирането на пробите риба и вода, включително подробности от приготвянето, съхранението, екстракцията и аналитичните процедури (и прецизност) за изпитваното вещество, и липидно съдържание.
- Методите за случаен подбор при третирането определяне на риба и разпределение на рибите по съдовете за изпитване.
- Дата на въвеждане на изпитваните организми в разтворите за изпитване и продължителност на изпитването.
- Описание на изпитванията за установяване на обхвата и резултатите от тях, ако има такива.

Резултати:

- резултати от всякакви извършени предварителни изследвания.
- Смъртност при контролните риби и рибите във всяка камера за експозиция и всякакво наблюдавано необичайно поведение.
- Информация за всички наблюдавани неблагоприятни ефекти.
- Пълно описание на всички използвани процедури за химичен анализ, включително границите на откриване и на количествено определяне, варирането и аналитичния добив.
- Липидното съдържание на рибата, включително използвания метод, и ако е получен, коефициентът за нормализация за липиди (L_n , коефициент за изразяване на резултатите спрямо 5 % липидно съдържание в рибата).
- Представяне в табличен вид на данните за теглото (и дължината), свързани с химичните концентрации за отделните риби (и липидното съдържание, ако е приложимо) както за контролните групи, така и за експонираните групи (например като се използват уникални идентификатори за всяка пробовзета риба) и изчисленията на получената константа (константи) на скоростта на растежа.

▼ M7

- Таблични данни за концентрацията на изпитваното вещество в рибата (C_f , свързана с отделните риби) и във водата (C_w) (със средни стойности за изпитваната група и контролата, стандартно отклонение и обхват, ако е уместно) за всички времена на пробовземане (C_f изразена в mg/kg мокро тегло за цялото тяло или за определени негови тъкани, например липиди и C_w в mg/l). Стойностите на C_w за контролните серии (фонът също се протоколира).
- Криви (включително всички измерени данни), показващи следното (ако е приложимо, концентрациите могат да бъдат изразени по отношение на цялото тяло и липидното съдържание може да е нормализирано към 5 % от животното или от определени негови тъкани):
 - растеж, т.е. тегло на рибата спрямо времето или ln-трансформирано тегло спрямо времето (включително получената константа на скоростта на растежа, k_g);
 - поглъщането и очистването на изпитваното вещество в рибата (върху една графика);
 - времето за достигане на стационарно състояние (ако бъде постигнато);
 - ln-трансформирана концентрация спрямо времето за поглъщане (включително получената константа на скоростта на поглъщането, k_1);
 - ln-трансформирана концентрация (ln-концентрация) спрямо времето за очистване (включително получената константа на скоростта на очистването, k_2); както и
 - кривите както на фазата на поглъщане, така на фазата на очистване, показващи както данните, така и изгладения модел.
- Ако при визуална проверка на графика се наблюдават очевидни стойности, силно различаващи се от нормалните, може да се приложи статистически валиден тест за стойности, силно различаващи се от нормалните, с оглед отстраняване на недостоверни точки с данни, както и документирана обосновка за тяхното пропускане.
- Коефициентът на биоконцентрация в стационарно състояние (BCF_{SS}), ако стационарното състояние е (почти) достигнато.
- Кинетичният коефициент на биоконцентрация (BCF_K) и получените константи на скоростта на поглъщане и на очистване k_1 и k_2 , заедно с дисперсиите в k_2 (наклон и пресечна точка), ако се използва последователно изглаждане.
- Доверителни граници, стандартно отклонение (при наличие) и методи за изчисление/анализ на данни за всеки използван параметър за всяка концентрация на изпитваното вещество.
 - Всякаква информация, относяща се до метаболити на изотопно белязано вещество и натрупването им.
 - Константа (константи) на скоростта на растежа (включително 95 % доверителен интервал (интервали)) и изчислени стойности на коригираната за растеж константа на скоростта на очистване (k_{2g}), полуразграждането и BCF (BCF_{Kg}).
 - Всичко необичайно относно изпитването, всяко отклонение от тези процедури и всякаква друга относима информация.
 - Обобщаваща таблица с относимите измерени и изчислени данни, както е по-долу:

▼ M7

Константи на скоростта на поглъщане и на очистване за вещество и коефициенти на биоконцентрация (BCF)	
k_g (константа на скоростта на растежа; ден ⁻¹):	Въвежда се стойност (95 % CI) ⁽¹⁾
k_1 (обща константа на скоростта на поглъщане; l kg ⁻¹ ден ⁻¹):	Въвежда се стойност (95 % CI) ⁽¹⁾
k_2 (обща константа на скоростта на очистване; ден ⁻¹):	Въвежда се стойност (95 % CI) ⁽¹⁾
k_2 (коригирана за растеж константа на скоростта на общото очистване; ден ⁻¹):	Въвежда се стойност (95 % CI) ⁽¹⁾
C_f (химична концентрация в рибата при стационарно състояние; mg kg ⁻¹):	Въвежда се стойност ± SD ⁽²⁾
C_w (химична концентрация във водата; mg l ⁻¹):	Въвежда се стойност ± SD ⁽²⁾
L_n (коефициент за нормализация за липиди):	Въвежда се стойност ⁽³⁾
BCF _{SS} (BCF при стационарно състояние; l kg ⁻¹):	Въвежда се стойност ± SD ⁽²⁾
BCF _{SSL} (BCF при стационарно състояние с нормализация за липиди; l kg ⁻¹):	Въвежда се стойност ± SD ⁽²⁾
BCF _K (кинетичен BCF; l kg ⁻¹):	Въвежда се стойност (95 % CI) ⁽¹⁾
BCF _{Kg} (коригиран за растеж кинетичен BCF; l kg ⁻¹):	Въвежда се стойност (95 % CI) ⁽¹⁾
$t_{1/2g}$ (коригиран за растеж период на полуразграждане; ден):	Въвежда се стойност (95 % CI) ⁽¹⁾
BCF _{KL} (кинетичен BCF с нормализация за липиди; l kg ⁻¹):	Въвежда се стойност
BCF _{KLg} (коригиран за растеж кинетичен BCF с нормализация за липиди; l kg ⁻¹):	Въвежда се стойност

⁽¹⁾ CI: доверителен интервал (където е възможно да се оцени)
⁽²⁾ SD: стандартно отклонение (където е възможно да се оцени)

Резултатите, протоколирани като „не се открива/не може да се определи количествено при границата на откриване/количествено определяне“ при разработване на метода за предварителното изпитване и при плана за опита, следва да се избягват, защото такива резултати не могат да се използват за изчисляването на константите за скорост.

V.13 — II: ИЗПИТВАНЕ ВЪРХУ РИБИ ПРИ СВЕДЕНА ДО МИНИМУМ ЕКСПОЗИЦИЯ ПО ВОДЕН ПЪТ

ВЪВЕДЕНИЕ

Нарастващият опит, натрупан при провеждането и тълкуването на цялостното изпитване, както от лаборатории, така и регулаторни органи, показва, че — с някои изключения — за изчисляване на константите на скоростта на поглъщане и очистване се прилага кинетика от първи порядък. По този начин константите на скоростта на поглъщане и очистване могат да се оценяват, и кинетичният BCF да се получава, с минимум точки на пробовземане.

Първоначалната цел за проучването на алтернативни модели за BCF изследвания беше да се разработи малко изпитване, което да бъде използвано в стъпка на междинно изпитване за опровергаване или потвърждаване на

▼ M7

оценките за BCF въз основа на K_{OW} и QSAR, и така да се елиминира необходимостта от цялостно изследване за много вещества, и да се сведат до минимум разходите и използването на животни чрез намаляване на пробоземанията и броя на извършваните аналитични серии. Макар и основният план на предходния метод за изпитване да беше следван, за да се даде възможност за интегриране на резултатите от изпитването със съществуващите данни за BCF и да се улесни изпълнението на изпитването и тълкуването на данните, целта бе да се представят оценки за BCF с достатъчна точност и прецизност за вземане на решения за оценка на риска. Много от същите съображения важат и за цялостното изпитване, напр. критериите за валидност (вж. точка 24) и спирането на изпитването, ако се наблюдава незначително поглъщане в края на фазата на поглъщане (вж. точки 16 и 38).

Веществата, които могат да отговарят на условията по плана за изпитването със свеждане до минимум на експозицията, следва да принадлежат към общата област, за която е разработен настоящият метод за изпитване, т.е. за неполярните органични вещества (вж. точка 49). Ако съществува признак, че веществото за изпитване може да има различно поведение (например ясно отклонение от кинетиката от първи порядък), следва да бъде извършено цялостно изпитване за регулаторни цели.

Обичайно продължителността на изпитването със свеждане до минимум на експозицията не е по-малка от тази на стандартното изпитване за BCF, но включва по-малко пробоземане на риби (вж. допълнение 6 за обяснението). Независимо от това, периодът за почистване може да бъде съкратен за бързо почистване вещества, за да се избегне падането на концентрациите в рибата под границата на откриване/количествено определяне преди края на изпитването. Изпитването върху риби със свеждане до минимум на експозицията, при което се прилага само една концентрация, може да се използва за определяне на необходимостта от цялостно изпитване, и ако получените данни, използвани за изчисляване на константите за скорост и BCF, са устойчиви (вж. точка 93), цялостното изпитване може да отпадне, ако полученият BCF е далеч от регулаторните стойности, означаващи повод за загриженост.

В някои случаи може да е полезно планът за изпитването със свеждане до минимум на експозицията да се осъществява с повече от една концентрация за изпитване като предварително изпитване за определяне дали оценките за BCF за дадено вещество са зависими от концентрацията. Ако оценките за BCF от изпитването със свеждане до минимум на експозицията показват зависимост от концентрацията, ще е необходимо извършването на цялостното изпитване. Ако въз основа на такова изпитване със свеждане до минимум на експозицията оценките за BCF не показват зависимост от концентрацията, но резултатите не се считат за окончателни, след това всяко последващо цялостно изпитване може да бъде извършено само при една концентрация, като по този начин се намалява използването на животни в сравнение с цялостно изпитване при две (или повече) концентрации.

Веществата, които потенциално отговарят на условията за изпитването със свеждане до минимум на експозицията, следва:

- да е вероятно да показват приблизително кинетика на поглъщане и почистване от първи порядък, напр. от асоцииране (read-across) с подобни вещества;
- да имат $\log K_{OW} < 6$, освен ако не се очаква бърз метаболизъм ⁽¹⁾;
- да са достатъчно разтворими във вода по отношение на техниката за анализ (вж. точка 24);
- да е ясно количествено определимо (т.е. концентрациите трябва да са най-малко с един порядък над границата на количествено определяне), както в рибите, така и във водата, препоръчва се изотопно белязване (вж. точка 23); както и
- да имат период на почистване, по-голям от техния прогнозиран период на полуразграждане (вж. допълнение 5 за изчисления), или продължителността на почистването следва да бъде съответно коригирана (вж. точка 91). Изключение от това правило се допуска, ако се очаква бърз метаболизъм на веществото.

⁽¹⁾ Изпитването със свеждане до минимум на експозицията в действителност може да бъде използвано за доказване на бърз метаболизъм, когато е известно, че е вероятна проява на бърз метаболизъм.

▼ **M7****ГРАФИК ЗА ПРОБОВЗЕМАНЕ ЗА ИЗСЛЕДВАНИЯ СЪС СВЕДЕН ДО МИНИМУМ ПЛАН****Пробовземане на риби**

Вземане на проби от риби се намалява до четири точки на пробовземане:

- в средата и в края на фазата на поглъщане (последната е и начало на очистването) напр. след 14 и 28 дни (33).
- В средата на фазата на очистване и при прекратяване на изследването (когато концентрацията на веществото е $< 10\%$ от максималната концентрация, или поне ясно е надвишила един период на полуразграждане на веществото), например след 7 и 14 дни очистване (33). Ако се очаква или наблюдава бързо очистване, може да е необходимо да се съкрати периодът за очистване, за да се избегнат концентрации в рибата, попадащи под границата на количествено определяне.
- Измерването на липидите е като в цялостното изследване.
- Корекцията за растеж е като в цялостното изследване.
- BCF се изчислява като кинетичен BCF.

Пробовземане на вода

При сведения до минимум план водата се пробовзема както при цялостното изследване (вж. точка 54) или поне пет пъти, равномерно разпределени през фазата на поглъщане, и веднъж в седмицата във фазата на очистването.

Изменения на плана

Като се вземат предвид свойствата на изпитваното вещество, валидните прогнози от QSAR и конкретната цел на изследването, могат да бъдат разгледани някои промени в плана на изследването:

- Ако е необходима по-голяма прецизност, за пробите в края на фазата на поглъщането могат да се използват повече на брой риби (6 или 8 вместо 4).
- Включване на „допълнителна“ група риби, която ще се използва, ако очистването на 14-ия ден (или на прогнозирания край на фазата на очистване) не е било достатъчно за адекватно очистване (т.е. $> 50\%$). Ако прогнозираната продължителност на фазата на очистването е по-малка или по-голяма от 14 дни, графикът за пробовземане следва да се коригира (т.е. една група риби в прогнозирания край на фазата на очистването, и една група след изтичане на половината от това време).
- Използване на две концентрации на изпитване за проучване на евентуална зависимост от концентрацията. Ако резултатите от изпитването със свеждане до минимум на експозицията, проведено с две концентрации за изпитване, показват, че BCF не е зависим от концентрацията (т.е. различава се с по-малко от 20%), една концентрация за изпитване може да се смята за достатъчна при цялостно изпитване, ако се провежда такава.
- Изглежда вероятно моделите на процесите на биоаккумуляция, например като тези, предложени от Arnot *et al.* (35), да могат да се използват за подпомагане при планирането на продължителността на фазите на поглъщане и очистване (виж също така допълнение 5).

Изчисления

Обяснението за този подход е, че коефициентът на биоконцентрация при цялостно изпитване може да бъде определен или като коефициент на биоконцентрация в стационарно състояние (BCF_{SS}) чрез изчисляване на отношението на концентрацията на изпитваното вещество в рибната тъкан към концентрацията на изпитваното вещество във водата, или чрез изчисляване на кинетичния коефициент на биоконцентрация (BCF_K) като отношение на константата на скоростта на поглъщането k_1 към константата на скоростта на очистване k_2 . BCF_K е валиден дори ако концентрацията на дадено вещество в стационарно състояние не е постигната по време на

▼ **M7**

поглъщането, при условие че поглъщането и почистването следват приблизително процеси с кинетика от първи порядък. Като абсолютен минимум, за да се направи оценка на константите на скоростта на поглъщане и почистване, се изискват две точки с данни, една в края на фазата на поглъщането (т.е. в началото на фазата на почистването) и една в края на фазата на почистването (или след значителна част от нея). Междинната точка за пробовземане се препоръчва като проверка на кинетиката на поглъщане и почистване⁽¹⁾. За изчисления вж. допълнения 5 и 6.

Тълкуване на резултатите

За оценка на валидността и информативната стойност на изпитването следва да се провери дали периодът за почистването надвишава един период на полуразграждане. Освен това BCF_{Km} (кинетичният BCF, получен от изпитване със свеждане до минимум на експозицията) следва да се сравни със стойността на минимизирания BCF_{SS} (която е BCF_{SS} , изчислена в края на фазата на поглъщане, като се допуска, че е достигнато стационарно състояние. Това може само да бъде допуснато, тъй като броят на точките на пробовземане не е достатъчен за доказването му). Ако $BCF_{Km} < \text{минимизирания } BCF_{SS}$, минимизираният BCF_{SS} следва да е предпочетената стойност. Ако BCF_{Km} е по-малко от 70 % от минимизирания BCF_{SS} , резултатите не са валидни и следва да се извърши цялостно изпитване.

Ако изпитването със свеждане до минимум на експозицията дава BCF_{Km} в област на стойност, подлежаща на регулиране, следва да се извърши цялостно изпитване. Ако резултатът е далеч от стойност, подлежаща на регулиране (доста над или под), може да не е необходимо цялостно изпитване, или може да се извърши цялостно изпитване с единична концентрация, ако това се изисква от относимата правна рамка.

Ако след изпитване със свеждане до минимум на експозицията с една концентрация е преценено, че е необходимо цялостно изпитване, то може да се извърши с втора концентрация. Ако резултатите са съгласувани, понататъшно цялостно изпитване при различна концентрация може да бъде избегнато, като биоконцентрацията на веществото не се очаква да зависи от концентрацията. Ако изпитването със свеждане до минимум на експозицията е проведено при две концентрации и резултатите не показват зависимост от концентрацията, цялостното изпитване може да бъде проведено само с една концентрация (вж. точка 87).

Протокол от изпитването

Протоколът от изпитването със свеждане до минимум на експозицията следва да включва цялата информация, изисквана за цялостното изпитване (вж. точка 81), с изключение на тази, която не е възможно да бъде получена (т.е. кривата, показваща времето за достигане на стационарно състояние и коефициентът на биоконцентрация в стационарно състояние; вместо последния следва да бъде посочен минимизираният BCF_{SS}). Освен това той следва да включва и мотивите за използване на изпитване със свеждане до минимум на експозицията, и получения от него BCF_{Km} .

V.13 — III: ИЗПИТВАНЕ ЗА БИОАКУМУЛАЦИЯ В РИБИ ПРИ ЕКСПОЗИЦИЯ ЧРЕЗ ХРАНИТЕЛНИЯ РЕЖИМ**ВЪВЕДЕНИЕ**

Методът, описан в настоящия раздел, следва да се използва за вещества, при които методологията за експозиция по воден път не е практически осъществима (например поради това, че не могат да бъдат поддържани стабилни и измерими концентрации във вода, или поради това, че не може да бъде погълнато достатъчно количество вещество в тялото в рамките 60-дневна експозиция; вж. предходните раздели за метода с експозиция по воден път). Следва обаче да се има предвид, че крайната точка от това изследване е коефициентът на биомултипликация от експозиция чрез хранителния режим (BMF), а не коефициентът на биоконцентрация (BCF)⁽²⁾.

На конференцията на SETAC Европа, проведена в Мадрид през май 2001 г. (36), беше представен нов метод за изпитване на биоаккумуляцията на малко разтворими във вода органични вещества. Тази работа се основаваше на различни протоколирани в литературата изследвания за биоаккумуляция с

⁽¹⁾ Когато се измерват само две точки с данни, оценките за доверителните граници за BCF_{Km} могат да бъдат направени чрез бутстрап методи. Когато са на разположение също и междинни точки с данни, доверителните граници за BCF_{Km} могат да се изчислят както при цялостното изпитване.

⁽²⁾ Вж. допълнение 1 за определения и мерни единици

▼ M7

метод за дозиране, включващ фуражи с добавка (напр. (37)). Рано през 2004 г. на работна група на ЕС за РВТ беше представен проект на протокол (38), предназначен за измерване на потенциала за биоаккумуляция на малко разтворими във вода органични вещества, при които методологията за експозиция по воден път не е практически осъществима, заедно с обяснителен документ (39), Допълнителна обосновка за метода е била, че възможната експозиция на околната среда на такива малко разтворими вещества (напр. $\log K_{OW} > 5$) може да бъде до голяма степен чрез хранителния режим (вж. (40) (41) (42) (43) (44)). По тази причина в някои публикувани регламенти за химикали⁽¹⁾ се прави препратка към изпитвания с експозиция чрез хранителния режим. Следва да се отбележи обаче, че в описания тук метод експозицията по воден път внимателно се избягва и следователно стойност на VMF от настоящия метод за изпитване не може да бъде пряко сравнявана със стойност на VMF от проучване на място (в което може да се комбинират както водата, така и хранителният режим).

Този раздел от настоящия метод за изпитване се базира на посочения протокол (38) и е нов метод, които не е фигурирал в предходната версия на МИ В.13. Това алтернативно изпитване дава възможност пътят на експозиция чрез хранителния режим да бъде пряко проучен при контролирани лабораторни условия.

Потенциалните изследователи следва да се позовават на точки 1-14 от настоящия метод за изпитване за информация кога изпитване с експозиция чрез хранителния режим може да бъде предпочетено пред изпитване с експозиция по воден път. Дадена е информация относно съображения за различни вещества и тя следва да се разгледа преди провеждането на изпитване.

Използването на изотопно белязани изпитвани вещества може да се разглежда със сходни съображения като тези за метода с експозиция по воден път (вж. точки 6 и 65).

Методът чрез хранителния режим може да се използва за изпитване на повече от едно вещество в едно единствено изпитване, при условие че са спазени определени критерии; те са разгледани по-долу в точка 112. За улеснение методиката тук описва изпитване, при което се използва само едно изпитвано вещество.

Изпитването чрез хранителния режим е сходно с метода с експозиция по воден път в много отношения, очевидно с изключение на пътя на експозиция. В резултат на това много от аспектите на метода, описани тук, се припокриват с метода с експозиция по воден път, описан в предходния раздел. Доколкото е възможно са давани кръстосани препратки към относимите точки в предишния раздел, но в интерес на четимостта и разбирането е неизбежно известно дублиране.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

Могат да се използват проточни или полустатични условия (вж. точка 4); проточни условия се препоръчват, за да се ограничи възможната експозиция на изпитваното вещество по воден път в резултат от десорбция от храни с добавка или изпражнения. Изпитването се състои от две фази: поглъщане (фураж с добавка от изпитваното вещество) и почистване (чист, нетретиран фураж) (вж. точка 16). Във фазата на поглъщането на „изпитвана“ група от риби се дава храна по определен хранителен режим от налична в търговската мрежа храна за риби с известен състав, към която ежедневно се добавя изпитваното вещество. В идеалния случай рибите трябва да консумират цялото количество дадена храна (вж. точка 141). След това по време на фазата на почистване на рибите се дава чистата, нетретирана храна за риби, налична в търговската мрежа. Що се отнася до метода с експозиция по воден път, могат да се използват при необходимост повече от една група на изпитване с различни концентрации на добавено изпитвано вещество, но

⁽¹⁾ За целите на Регламент (ЕО) № 1907/2006 относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH) (ОВ L 396, 30.12.2006 г., стр. 1) този въпрос е разгледан в „Ръководство относно изискванията за информация и оценката на безопасността на химичните вещества“, глава R.7с, R.7.10.3.1; R.7.10.4.1; и фигура R7.10-2.

▼ M7

за по-голямата част от силно хидрофобните изпитвани органични вещества е достатъчна една група на изпитване (вж. точки 49 и 107). Ако се използват полустатични условия, рибите следва да бъдат прехвърлени в нова среда и/или в нова изпитвателна камера в края на фазата на поглъщане (в случай че средата и/или апаратът, използвани във фазата на поглъщането, са били замърсени с изпитваното вещество чрез просмукване). Концентрациите на изпитваното вещество в рибите се измерват и в двете фази на изпитването. В допълнение към групата от риби, хранена с хранителния режим с добавка (изпитваната група), една контролна група риби се държи при идентични условия и се храни по същия начин, с изключение на това, че режимът с налична в търговската мрежа храна не включва добавка с изпитваното вещество. Тази контролна група позволява количествено определяне на фоновите нива на изпитваното вещество в неекспонираните риби и служи за сравнение за всеки несвързан с третирането неблагоприятен ефект, отбелязан в изпитваната група (групи) ⁽¹⁾. Тя също така дава възможност за сравнение на константите на скоростта на растеж между групите като проверка, че са консумирани сходни количества от предлагания хранителен режим (потенциалните разлики във вкусовите качества между хранителните режими също трябва да се отчитат за обясняване на различните константи на скоростта на растеж; вж. точка 138). Важно е, че както през фазата на поглъщане, така и при почистването, изпитваните и контролните групи следва да бъдат хранени с еквивалентни в хранително отношение хранителни режими.

Фаза на поглъщане с продължителност 7-14 дни по правило е достатъчна, въз основа на опита на разработилите метода (38) (39). Този обхват следва да сведе до минимум разходите за извършване на изпитването, като същевременно се гарантира достатъчна експозиция за повечето вещества. В някои случаи обаче фазата на поглъщане може да бъде удължена (вж. точка 127). По време на фазата на поглъщане концентрацията на веществото в рибата може да не достигне стационарно състояние, така че обработката на данни и резултатите от този метод обикновено се основават на кинетичен анализ на тъкани остатъци. (Забележка: Уравненията за изчисляване на времето за достигане на стационарно състояние могат да се прилагат тук така, както в изпитването с експозиция по воден път — вж. допълнение 5). Фазата на почистването започва, когато на рибите за първи път се дава хранителен режим без добавка, и обикновено е с продължителност до 28 дни или докато изпитваното вещество вече не може да бъде количествено определено в цели риби, в зависимост от това кое настъпва по-рано. Фазата на почистването може да се съкрати или удължи спрямо срока от 28 дни, в зависимост от промяната във времето на измерените химични концентрации и размерите на рибите.

Настоящият метод позволява определянето на специфичния за веществото период на полуразграждане ($t_{1/2}$ от константата за скоростта на почистване, k_2), ефикасността на усвояването (абсорбцията в червата; a), кинетичния коефициент на биомултипликация от експозиция чрез хранителния режим (BMF_K), коригирания за растеж кинетичен коефициент на биомултипликация от експозиция чрез хранителния режим (BMF_{K_g}), коригирания за липиди ⁽²⁾ кинетичен коефициент на биомултипликация от експозиция чрез хранителния режим (BMF_{K_L}) (и/или коригирания за растеж и за липиди кинетичен коефициент на биомултипликация от експозиция чрез хранителния режим, $BMF_{K_{g_L}}$) за изпитваното вещество в рибите. Както за метода с експозиция по воден път, увеличението на масата на рибата по време на изпитването ще доведе до намаляване на концентрацията на изпитваното вещество в рибата, чиято маса нараства, като по този начин ще се подцени (кинетичният) BCF, ако не бъде коригиран с растежа (срв. точки 162 и 163). Освен това, ако се прецени, че стационарното състояние е постигнато във фазата на поглъщането, може да се изчисли ориентировъчен BMF в стационарно състояние. Налични са подходи, които правят възможно оценяването на кинетичния коефициент на биоконцентрация (BCF_K) въз основа на данните, получени при изследването чрез хранителния режим (напр. (44) (45) (46) (47) (48)). Предимствата и недостатъците на такива подходи се обсъждат в допълнение 8.

⁽¹⁾ За повечето изпитвани вещества в идеалния случай не следва да има откриване в контролата на вода. Фоновите концентрации могат да са относими само за естествени материали (напр. някои метали) и вещества, които са разпространени в околната среда.

⁽²⁾ Доколкото BMF се определя като отношение на концентрацията на дадено вещество в даден организъм към тази в храната за този организъм в стационарно състояние, липидите се вземат предвид чрез коригиране за съдържанието на липиди в организма и в храната, поради което се описва по-точно като „корекция“. Този подход се различава от „нормализацията“ към определено липидно съдържание в организма, каквато се извършва в изпитването за биоконцентрация при експозиция по воден път.

▼ **M7**

Изпитването е планирано главно за малко разтворими неполярни органични вещества, които следват приблизително кинетика на поглъщане и очистване от първи порядък в риби. Ако се изпитва вещество, които не следва приблизително кинетика на поглъщане и очистване от първи порядък, следва да се прилагат по-сложни модели (вж. позоваванията в приложение 5) и следва да се потърси консултация от статистик в областта на биологията и/или специалист в областта на фармакокинетиката.

Обикновено ВМФ се определя чрез анализ на изпитваното вещество в цяла риба (на база мокро тегло). Ако е относимо към целите на проучването, могат да бъдат пробовзети специфични тъкани (напр. мускули, черен дроб), ако рибата е разделена на ядивни и неядивни части (вж. точка 21). Освен това могат да се използват отстраняване и отделен анализ на стомашно-чревния тракт, за да се определи приносът към концентрациите в цялата риба за точките на пробовземане в края на фазата на поглъщане и в близост до началото на фазата на очистването, или като част от подход на масов баланс.

Липидното съдържание на пробовзетите цели риби следва да се измерва така, че концентрациите да могат да бъдат коригирани за липиди, при отчитане на липидното съдържание както на хранителния режим, така и на рибите (вж. точки 56 и 57 и допълнение 7).

Теглото на пробовзетите отделни екземпляри следва да бъде измерено и записано, и да бъде свързано с анализираната химична концентрация за съответния отделен екземпляр (например като се протоколира чрез използване на уникален идентификационен код за всяка пробовзета риба), за целите на изчисляването на растежа, който може да настъпи по време на изпитването. Общата дължина на рибата също следва да се измери, когато това е възможно⁽¹⁾. Данните за теглото също са необходими за оценяване на ВСФ с използване на данните от очистването от изпитването чрез хранителния режим.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

Следва да е на разположение информация за изпитваното вещество, както е описана в точки 3 и 22. Метод за анализ на концентрациите на изпитваното вещество във вода обикновено не е необходим; изискват се методи с подходяща чувствителност за измерването на концентрациите в храната за риби и в тъканите на рибите.

Методът може да се използва за изпитване на повече от едно вещество в едно единствено изпитване. Независимо от това, изпитваните вещества трябва да са съвместими едно с друго, така че да не си взаимодействат или да изменят своята химична идентичност при добавяне в храната за риби. Целта е измерените резултати за всяко вещество, изпитвано заедно с други, да не се различават значително от резултатите, които биха се получили, ако се проведат отделни изпитвания за всяко изпитвано вещество. Предварителната аналитична работа следва да установи аналитичния добив за всяко вещество от храна с множество добавки и от проба от рибна тъкан i) с висок аналитичен добив (напр. > 85 % от номиналния) и ii) с необходимата чувствителност за изпитване. Общата доза на веществата, изпитвани заедно, следва да е под комбинираната концентрация, която може да доведе до токсични ефекти (вж. точка 51). Освен това, възможните неблагоприятни ефекти в рибата и потенциалът за ефекти от взаимодействия (например метаболитни ефекти), свързани с едновременно изпитване на множество вещества, трябва да се вземат под внимание при планирането на опита. Едновременното изпитване на вещества, които могат да съществуват в йонизирано състояние, трябва да се избягва. По отношение на експозицията, методът е подходящ и за сложни смеси (вж. точка 13, въпреки че при анализа се прилагат същите ограничения, каквито за всеки друг метод).

ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

За да бъде валидно дадено изпитване се прилагат следните условия (вж. точка 24):

— Варирането на температурата на водата е по-малко от ± 2 °C в третираните или контролните групи

⁽¹⁾ Общата дължина следва също така да се запише по време на изпитването, тъй като тя е добър показател за това, дали е настъпило неблагоприятно въздействие.

▼ M7

- Концентрацията на разтворения кислород не пада под 60 % от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух;
- Концентрацията на изпитваното вещество в храната на рибата преди и в края на фазата на поглъщане е в рамките на обхват $\pm 20\%$ (въз основа на най-малко три проби от двете времеви точки)
- Предварителната аналитична работа върху хранителния режим с добавката следва да докаже висока степен на хомогенност на веществото в храната; най-малко три концентрации на проби от веществото, взети в началото на изпитването, трябва да не се отклоняват с повече от $\pm 15\%$ от средната стойност
- В храната без добавка или в тъканите от контролните риби концентрации на изпитваното вещество не се откриват или присъстват единствено като следи, за разлика от третираните проби
- Смъртността или други неблагоприятни ефекти/болести в рибите както от контролната, така и от третираната група, следва да е по-малка от 10 % в края на изпитването; Ако изпитването се удължава на каквото и да е основание, неблагоприятните ефекти в двете групи са $\leq 5\%$ на месец и $\leq 30\%$ кумулативно. Значими различия в средния растеж между изпитваните и контролните групи, включени в пробовзетите риби, могат да са показател за токсично въздействие на изпитваното вещество.

РЕФЕРЕНТНИ ВЕЩЕСТВА

Ако дадена лаборатория не е извършвала изследването преди това, или са направени съществени промени (например промяна на породата на рибите или доставчика, различни видове риби, значителна промяна в размера на рибите, в храна за риби или в метода за добавянето и др.), е целесъобразно да се проведе проучване на техническата компетентност, с използване на референтно вещество. Референтното вещество се използва най-вече за установяване дали техниката за добавяне в храната е подходяща, за да осигури максимална хомогенност и бионаличност на изпитваните вещества. Един пример, който се използва в случай на неполярни хидрофобни вещества, е хексахлоробензенът (НСВ), но следва да бъдат взети предвид други вещества със съществуващи надеждни данни за поглъщането и биомултипликацията поради опасните свойства на НСВ⁽¹⁾. Ако се използва основна информация за референтното вещество, тя трябва да се представи в протокола от изпитването, включително наименование, чистота, номер по CAS, структура, данни за токсичност (при наличност), както за изпитваните вещества (вж. точки 3 и 22).

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**Апаратура**

Материалите и апаратурата трябва да се използват както е описано в метода с експозиция по воден път (вж. точка 26). Трябва да бъде използвана проточна система или статична система за изпитване с обновяване, която да осигурява достатъчен обем вода за разреждане до съдовете за изпитване. Дебитите следва да се записват.

Вода

Трябва да се използва вода за изпитване, както е описано в метода с експозиция по воден път (вж. точки 27-29). Средата за изпитване следва да се характеризира, както е описано, и нейното качество трябва да остава постоянно по време на изпитването. Съдържанието на природни частици, а също и общият органичен въглерод трябва да са възможно най-ниски (≤ 5 mg/l твърди частици; ≤ 2 mg/l общ органичен въглерод) преди започване на изпитването. ТОС трябва да се измери само преди изпитването, като част от характеризирането на водата за изпитване (вж. точка 53).

⁽¹⁾ НСВ е включен в приложения А и В към Стокхолмската конвенция, и в приложения I и III към Регламент (ЕО) № 850/2004 относно устойчивите органични замърсители (ОВ L 158, 30.4.2004 г., стр. 7)

▼ **M7****Хранителен режим**

Препоръчва се предлагана в търговската мрежа храна за риби (хранителен режим с плаващи и/или бавно потъващи пелети), която е характеризирана по отношение най-малко на съдържание на белтъци и на мазнини. Храната следва да е с еднакъв размер на пелетите, за да се повиши ефикасността на експозицията чрез фуража, т.е. рибата ще консумира повече от храната, вместо да консумира по-големите парчета и да пропуска по-малките. Пелетите следва да са подходящо оразмерени в съответствие с размерите на рибата в началото на изпитването (например може да се използват пелети с диаметър около 0,6-0,85 mm за риби с обща дължина между 3 и 7 cm, и 0,85-1,2 mm за риби с обща дължина между 6 и 12 cm). Размерите на пелетите могат да бъдат коригирани в зависимост от растежа на рибите в началото на фазата на очистиране. Пример за подходящ състав на храната, доставяна от търговската мрежа, е даден в допълнение 7. При разработването на настоящия метод са били широко използвани хранителни режими за изпитване с общо липидно съдържание между 15 и 20 % (w/w). Храна за риби с толкова висока липидна концентрация може да не е налична в някои региони. В такива случаи изследванията могат да се проведат с по-ниска липидна концентрация в храната и при необходимост скоростта на хранене може да се коригира по подходящ начин за поддържане на здравето на рибите (въз основа на предварително изпитване). Общото съдържание на липиди в хранителния режим на изпитваната и на контролната група трябва да бъде измерено и записано преди началото на изпитването и в края на фазата на поглъщане. В протокола от изследването следва да бъдат представени подробни данни от доставчика на фуражи от търговската мрежа за анализа на хранителните елементи, влагата, влакнините и пепелното съдържание и, ако е възможно, минералите и пестицидните остатъци (напр. „стандартните“ приоритетни замърсители).

При добавянето на изпитваното вещество в храната следва да се положат всички възможни усилия, за да се гарантира хомогенност навсякъде в храната за изпитването. Концентрацията на изпитваното вещество в храната за групата за изпитване следва да се избира в зависимост от чувствителността на метода за анализ, токсичността на изпитваното вещество (NOEC, ако е известен) и относимите физични и химични данни. Ако се използва референтно вещество, за предпочитане е то да бъде включено в концентрация около 10 % от тази на изпитваното вещество (или във всеки случай толкова ниска, колкото е практически възможно), в зависимост от чувствителността на анализа (напр. за хексахлоробензена е приета за приемлива концентрация в храната от 1-100 µg/g; вж. (47) за повече информация относно ефикасността на усвояването на НСВ).

Изпитваното вещество може да се добави към храна за риби по няколко начина, в зависимост от неговите физични характеристики и разтворимост (вж. допълнение 7 за повече подробности относно методите за добавяне):

- Ако е разтворимо и стабилно в триглицериди, веществото следва да се разтвори в малко количество рибно масло или хранително растително масло, преди да бъде смесено с храната за риби. В този случай трябва да се внимава да се избегне получаването на дажба с прекомерно високо съдържание на липиди, като се вземе предвид естественото съдържание на липиди във фуража с добавка, чрез добавяне на минимално известно количество масло, необходимо за достигане на разпределение и хомогенност на изпитваното вещество в храната, или;
- Добавянето към храната следва да е с помощта на подходящ органичен разтворител, така че да не се компрометират хомогенността и бионаличността (възможно е в храната да се образуват (микро) кристали от изпитваното вещество, в резултат от изпаряване на разтворител, и няма лесен начин да се докаже, че това не се е случило; вж. (49)), или;
- Невискозните течности следва да се добавят направо към храната за риби, но те трябва да бъдат добре смесени, за да се подпомогне хомогенността и да се улесни доброто усвояване. Техниката за смесване следва да гарантира хомогенността на фуража с добавката.

▼ **M7**

В някои случаи, напр. при по-малко хидрофобни изпитвани вещества, за които има по-голяма вероятност за десорбция от храната, може да се окаже необходимо приготвените хранителни пелети да се покрият с малко количество царевично/рибено масло (вж. точка 142). В подобни случаи контролната храна трябва да се обработи по сходен начин, а за измерване на липидите следва да се използва крайният приготвен фураж.

Ако се използват резултатите за референтното вещество, те следва да бъдат сравними с данните от проучванията в литературата, извършвани при сходни условия, със сходна скорост на хранене (вж. точка 45), а специфичните за референтното вещество параметри следва да отговарят на относителните критерии в точка 113, (пунктове 3, 4 и 5).

Ако за носител се използва масло или носещ разтворител за изпитваното вещество, еквивалентно количество от същия носител (без изпитваното вещество) следва да се смеси с контролния хранителен режим с оглед да се поддържа еквивалентността с хранителния режим с добавка. Важно е, че както през фазата на поглъщане, така и при очистването, изпитваните и контролните групи следва да бъдат хранени с еквивалентни в хранително отношение хранителни режими.

Хранителният режим с добавка трябва да се съхранява при условия, които запазват стабилността на изпитваното вещество в рамките на фуражния микс (например с охлаждане), и тези условия се протоколират.

Избор на видове риби

могат да бъдат използвани видове риби, посочени при експозицията по воден път (вж. точка 32 и допълнение 3). Преди публикуването на настоящия МИ, в изследванията за биоаккумуляция на органични вещества чрез хранителния режим широко са използвани дъговата пъстърва (*Oncorhynchus mykiss*), шаранът (*Cyprinus carpio*) и *Pimephales promelas*. Изпитваният вид следва да имат поведение при хранене, което води до бърза консумация на приложената дажба храна, за да се гарантира, че всеки фактор, който влияе върху концентрацията на изпитваното вещество в храната (напр. просмукването във водата и възможността за експозиция по воден път), е сведен до минимум. Следва да бъдат използвани риби в рамките на препоръчания размер/тегло (вж. допълнение 3). Отделните риби следва да не са толкова малки, че да възпрепятстват лесното анализиране. Видовете, изпитвани по време на стадий от жизнения цикъл с бърз растеж, могат да усложнят тълкуването на данните, а високите скорости на растеж могат да окажат влияние върху изчисляването на ефикасността на усвояването⁽¹⁾.

Отглеждане на рибата

Преди започването на изпитването критериите за аклиматизацията, смъртността и допустимостта на заболявания са същите, както за метода с експозиция по воден път (вж. точки 33-35).

ПРОВЕЖДАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

Предварително изследване и изпитване за установяване на обхвата

Аналитичната работа в предварителното изследване е необходима, за да се докаже аналитичен добив на веществото от храната с добавка/тъканта от риба с добавка. Изпитване за установяване на обхвата за избиране на подходяща концентрация в храната не е винаги необходимо. За доказване на отсъствието на неблагоприятни последици и за оценка на вкусовите качества на хранителния режим с добавка, на чувствителността на метода за анализ за рибната тъкан и храната, както и на подбора на подходящи скорост на хранене и интервали за пробовземане през фазата на очистване и др., могат да бъдат извършени предварителни опити с хранене, но те не са задължителни. Предварителното изследване може да бъде полезно за оценка

⁽¹⁾ В случай на бърз растеж през фазата на поглъщане истинската скорост на хранене ще намалее под определената в началото на експозицията.

▼ **M7**

на броя на рибите, необходими за вземане на проби по време на фазата на почистване. Това може да доведе до значително намаляване на броя на използваните риби, специално при изпитвани вещества, които са особено лесно метаболизиращи.

Условия на експозиция*Продължителност на фазата на поглъщане*

Обикновено е достатъчна фаза на поглъщане с продължителност 7-14 дни, по време на която една група риби са хранени с контролен хранителен режим, а друга група риби са хранени с хранителен режим за изпитването ежедневно, при фиксирана дажба в зависимост от изпитвания вид и условията на опита, напр. между 1-2 % от теглото на тялото (мокро тегло) в случай на дъгова пъстърва. Скоростта на храненето следва да се избира така, че да се избягват бърз растеж и голямо увеличение на липидното съдържание. Ако е необходимо, фазата на поглъщане може да бъде удължена въз основа на практически опит от предходни изследвания или от познания за поглъщането/очищването на изпитваното вещество (или на аналога) в риби. Началото на изпитването се определя като моментът на първото подаване на храна с добавка. Денят от опита започва да тече от момента на хранене до малко преди момента на следващото хранене (например един час преди него). По този начин първият ден от опита за поглъщането започва от първото подаване на храна с добавка и приключва малко преди второто подаване на храна с добавка. На практика фазата на поглъщане приключва малко преди първото подаване на храна без добавено изпитвано вещество (например един час преди подаването), тъй като рибата ще продължи да смила храната с добавка и да абсорбира изпитваното вещество в междинните 24 часа. Важно е да се гарантира, че се достига натрупване на достатъчно високо (негтоксично) количество от изпитваното вещество в организма, предвид метода за анализ, така че по време на фазата на почистване да може да се измери спад поне с един порядък. В специални случаи може да се използва удължена фаза на поглъщане (до 28 дни), с допълнително вземане на проби, за опознаване на кинетиката на поглъщане. По време на поглъщането концентрацията в рибата може да не достигне стационарно състояние. Уравненията за изчисляване на времето за достигане на стационарно състояние като индикация за вероятната продължителност, необходима за постигане на значителни концентрации в рибите, могат да се прилагат тук така, както в изпитването с експозиция по воден път (вж. допълнение 5).

В някои случаи може да е известно, че поглъщането на веществото в рибата в рамките на 7-14 дни, поради недостатъчна аналитична чувствителност или поради ниска ефикасност на усвояването, ще се окаже недостатъчно, за да може използваната концентрация в храната да достигне концентрация в рибата, която да е достатъчно висока, за да се анализира спад от най-малко един порядък по време на почистването. В такива случаи може да е полезно да се увеличи продължителността на първоначалната фаза на хранене на повече от 14 дни или, особено за изключително лесно метаболизируеми вещества, следва да се разгледа по-висока концентрация в хранителния режим. Независимо от това трябва да се внимава поглъщането на вещество в тялото по време на поглъщането да се запази под (оценката за) хроничната концентрация без наблюдаван ефект (NOEC) в рибната тъкан (вж. точка 138).

Продължителност на фазата на почистването

Очищването обикновено продължава до 28 дни, като започва след като на изпитваната група риби се подаде чиста, нетретирана храна след фазата на поглъщане. Очищването започва с първото подаване на храна без добавка, а не веднага след подаването на последната храна с добавка, тъй като рибата ще продължи да смила храната и да абсорбира изпитваното вещество в междинните 24 часа, както е посочено в точка 126. Следователно първата проба при фазата на почистването се взема малко преди второто подаване на храна без добавка. Този период на почистване е планиран за откриване на вещества с потенциален период на полуразграждане до 14 дни, което съответства на периода при биоакмулиращи вещества⁽¹⁾, така че 28 дни включват два периода на полуразграждане на такива вещества. В случаите

⁽¹⁾ В изследване с експозиция по воден път 14-дневен период на полуразграждане би съответствал на BCF от около 10 000 l/kg, като се използва риба от 1 g със съответна скорост на поглъщане от около 500 l/kg/ден (в съответствие с уравнението на Sijm *et al* (46)).

▼ M7

на много силно биоакмулиращи вещества може да е полезно да се удължи фазата на очистиането (ако има признаци за това от предварителни изпитвания).

Ако едно вещество се очисти много бавно, така че не може да се определи точното време на полуразграждане при фазата на очистиането, информацията може все пак да е достатъчна за целите на оценката като признак на висока степен на биоаккумуляция. И обратно, ако дадено вещество се очисти толкова бързо, че не могат да бъдат получени надеждни концентрации във времева точка нула (концентрация в края на поглъщането/началото на очистиането, $C_{0,d}$) и k_2 , може да се направи консервативна оценка за k_2 (вж. допълнение 7).

Ако анализите на рибите при по-ранните интервали (например 7 или 14 дни) показват, че веществото е очистено под равнищата на количествено определяне на нивата преди пълния 28-дневен период, тогава последващите пробовземания могат да се преустановят и изпитването може да бъде прекратено.

В малко случаи може да не се получи измеримо поглъщане на изпитваното вещество в края на периода на поглъщане (или при втората проба от очистиането). Ако може да се докаже, че: i) критериите за валидност в точка 113 са изпълнени; и ii) отсъствието на поглъщане не се дължи на друг недостатък на изпитването (например продължителността на поглъщането не е достатъчна, недостатък в техниката за добавяне към храната, водещ до влошаване на бионаличността, липса на чувствителност на метода за анализ, риби, които не консумират храната и др.); може да е възможно изпитването да се прекрати, без да се налага повторното му стартиране с по-голям продължителност на поглъщането. Ако предварителната работа е показала, че е възможно случаят да е такъв, може да е препоръчително като част от подхода „масов баланс“, ако е възможно, да се извърши анализ на фекалиите за неразградено изпитвано вещество.

Брой на изпитваните риби

Подобно на изпитването с експозиция по воден път следва да бъдат избрани риби със сходно тегло и дължина, като най-малката риба е не по-малко от две трети от теглото на най-голямата (вж. точки 40-42).

Общият брой на рибите за проучването следва да бъде избран въз основа на графика за пробовземане (минимум една проба в края на фазата на поглъщане и четири до шест проби по време на фазата на очистиане, но в зависимост от продължителността на фазите), като се отчита чувствителността на техниката за анализ, на концентрацията, която е вероятно да бъде постигната в края на фазата на поглъщане (въз основа на придобитите порано знания) и продължителността на очистиането (ако придобитите порано знания позволяват оценка). Всеки път следва да бъдат пробовзети от пет до десет риби, с параметри на растежа (тегло и обща дължина), измервани преди извършването на химичен анализ или анализ на липиди.

Поради присъщото вариране в размера, скоростта на растеж и физиологията сред рибите, и вероятното вариране в количеството на подадената храна, която консумира всяка риба, следва да се пробовземат най-малко пет риби при всеки интервал от изпитваната група и пет от контролната група, за да се установи по адекватен начин средната концентрация и нейното вариране. Варирането между използваните риби вероятно ще допринесе повече за общото неконтролируемо вариране в изпитването, отколкото варирането, присъщо на използваните методики за анализ, и следователно обосновава използването на максимум до десет риби в точка за пробовземане в някои случаи. Независимо от това, ако в началото на очистиането в контролните риби не са измерими фонови концентрации на изпитваното вещество, в последния интервал на пробовземане може да бъде достатъчен химичен анализ само на две-три контролни риби, при условие че останалите контролни риби във всички точки на пробовземане все пак се пробовземат за тегло и обща дължина (така че същият брой се пробовзема от изпитваните и от контролните групи за растеж). Рибите следва да се съхраняват, претеглени индивидуално (дори ако се окаже необходимо резултатите от пробата да се комбинират впоследствие) и с измерена обща дължина.

▼ **M7**

За стандартно изпитване, например с 28-дневна продължителност на очистиране, включително пет пробоземания през очистирането, това означава общо 59-120 риби от изпитваните и 50-110 риби от контролните групи, като се допуска, че техниката за анализ на веществото позволява анализът на липидното съдържание да се извършва върху същата риба. Ако анализът на липидното съдържание не може да бъде проведен върху същата риба, върху която е проведен химичният анализ, и ако използването на контролна риба само за анализ на липиди също не е осъществимо (вж. точка 56), ще се изискват допълнителни 15 риби (три от изходната популация в началото на изпитването, по три от всяка контролна и изпитвана група в началото на очистирането и по три от всяка контролна и изпитвана група в края на опита). Пример за график за пробоземане с брой риби може да се намери в допълнение 4.

Зареждане

Трябва да се използват големи съотношения вода към риба, както е описано в метода с експозиция по воден път (вж. точки 43 и 44). Въпреки че скоростите на зареждане риба към вода не влияят върху концентрациите на експозиция в настоящото изпитване, препоръчва се скорост на зареждане от 0,1 до 1,0 g риба (мокро тегло) за литър вода на ден, за да се поддържа достатъчни концентрации на разтворения кислород и да се сведе до минимум стресът в изпитвания организъм.

Хранителен режим за изпитването и хранене

През периода на аклиматизация рибите следва да бъдат хранени с подходящ хранителен режим, както е описано по-горе (точка 117). Ако изпитването се провежда при проточни условия, потокът трябва да бъде спрял по време на храненето на рибите.

По време на изпитването хранителният режим за изпитваната група следва да се придържа към описания по-горе (точки 116-121). Изборът на прицелната концентрация на добавката следва да отчита вкусовите качества на храната (така че рибите да не избягват храната), в допълнение към разглеждането на специфичните за веществото фактори, аналитичната чувствителност, очакваната концентрация в хранителния режим при условия на околната среда и нивата на хроничната токсичност/поглънатото вещество в тялото. Номиналната концентрация на добавката на изпитваното вещество трябва да бъде документирана в протокола. Въз основа на опита, концентрации на добавка в обхвата 1-1 000 µg/g предоставят практически работен обхват за изпитвани вещества, които не проявяват специфичен токсичен механизъм. За вещества, които действат чрез неспецифичен механизъм, нивата на остатъци в тъканите не трябва да превишават 5 µmol/g липиди, тъй като остатъците над това ниво вероятно предизвикват хроничните ефекти (19) (48) (50)⁽¹⁾. За други вещества трябва да се вземат мерки да няма неблагоприятни въздействия от натрупаната експозиция (вж. точка 127). Това се отнася особено за случаите, когато повече от едно от вещества се изпитват едновременно (вж. точка 112).

Подходящото количество изпитвано вещество може да се добави към храната за риби по един от три начина, както е описано в точка 119 и допълнение 7. Методите и процедурите за добавяне към фуража следва да бъдат документирани в протокола. Нетретираната храна се подава на контролните риби, като тя съдържа еквивалентно количество масло без добавка като носител, ако е използвано такова във фуража с добавка при фазата на поглъщане, или се обработва с „чист“ разтворител, ако за приготвянето на хранителния режим за изпитваната група като носител е използван разтворител. Третираните и нетретираните хранителни режими следва да бъдат измерени аналитично поне в три повторения за концентрация на изпитваното вещество преди началото на фазата на поглъщане и в края на тази фаза. След експозиция на третирания фураж (фаза на поглъщане), на рибите (и от двете групи) се подава нетретирана храна (фаза на очистиране).

На рибите се подава фиксирана дажба (в зависимост от вида; например около 1-2 % от мокрото телесно тегло на ден в случай на дъгова пъстърва). Скоростта на храненето следва да се избира така, че да се избягват бърз

⁽¹⁾ Тъй като действителните вътрешни концентрации могат да бъдат определени само след като е било извършено изпитването, е необходима оценка на очакваната вътрешна концентрация (напр. въз основа на очаквания BMF и концентрацията в храната; вж. уравнение A5.8 в допълнение 5).

▼ M7

растеж и голямо увеличение на липидното съдържание. Точната скорост на хранене, определена по време на опита, следва да бъде документирана. Първоначалното хранене следва да се основава на измерванията по график на теглото в изходната популация непосредствено преди началото на изпитването. Количеството фураж следва да се коригира въз основа на мокрото тегло на пробовзетите риби при всяко вземане на проби, за да се отчита растежът по време на опита. Теглото и дължините на рибите в съдовете за изпитване и контролните съдове могат да бъдат оценени въз основа на теглото и общите дължини на рибите, използвани при всяко вземане на проби; не се претеглят или измерват рибите, останали в съдовете за изпитване и контролните съдове. Важно е да се запази същата определена скорост на хранене по време на целия опит.

Храненето следва да се наблюдава, за да е сигурно, че рибите очевидно консумират цялото количество подадена храна с оглед да се гарантира, че в изчислението се използват подходящите скорости на поглъщане. Предварителните опити с хранене или предходният опит следва да бъдат взети под внимание при избора на скорост на хранене, която ще гарантира, че се консумира цялото подавано веднъж дневно количество храна. В случай, че храната последователно се оставя неконсумирана, може да е препоръчително дозата да се разпредели върху допълнителен период на хранене във всеки ден от опита (напр. замяна на храненето веднъж дневно с хранене с половината количество два пъти дневно). Ако това е необходимо, второто хранене следва да се извършва в определено време и да е планирано така, че максималният възможен период от време да е преди пробовземане на риби (напр. времето за второто хранене се определя в рамките на първата половина от деня на опита).

Въпреки че като цяло рибите бързо консумират храната, важно е да се гарантира, че веществото остава адсорбирано върху храната. Следва да се положат усилия за избягване на диспергирането на изпитваното вещество във вода от храната, като по този начин рибата се експонира на действието на концентрации по воден път на изпитваното вещество, в допълнение към хранителния режим. Това може да се постигне чрез отстраняване на неконсумираната храна (и фекалии) от съдовете за изпитване и контролните съдове в рамките на един час след хранене, но за предпочитане в рамките на 30 минути. В допълнение, може да бъде използвана една система, в която водата се почиства редовно през филтър с активен въглен, за да се абсорбира евентуален „разтворен“ замърсител. Проточните системи могат да помогнат за бързо отмиване на хранителните частици и разтворените вещества⁽¹⁾. В някои случаи за разрешаването на този проблем може да помогне леко модифицирана техника за приготвяне на храни с добавка (вж. точка 119).

Светлина и температура

Както при метода с експозиция по воден път (вж. точка 48), препоръчва се от 12 до 16 часа излагане на светлина, а температурата (± 2 °C) трябва да е подходяща за изпитвания вид (срв. допълнение 3). Типът и характеристиките на осветлението трябва да са познати и да се документират.

Контроли

Следва да се използва една контролна група, като на рибите се подава същата дажба като на изпитваната група, но без изпитваното вещество във фуража. Ако за добавянето в храната на изпитваната група като носител е използвано масло или разтворител, храната на контролната група следва да се обработи по напълно идентичен начин, но в отсъствие на изпитваното вещество, така че хранителните режими на изпитваната група и контролната група да са еквивалентни (вж. точки 121 и 139).

⁽¹⁾ Присъствието на изпитваното вещество в средата за изпитване в резултат на екскреция от риби или на просмукване от храна може да не е напълно предотвратимо. Следователно един от вариантите е да се измери концентрацията на веществото във вода в края на периода на поглъщане, особено ако се използва полустатична постановка, за подпомагане на установяването дали е имало експозиция по воден път.

▼ M7**Честота на измерванията на качеството на водата**

Условията, описани в метода с експозиция по воден път, се прилага и тук, с изключение на това, че ТОС трябва да се измери само преди изпитването като част от характеризирането на водата за изпитване (вж. точка 53).

Пробовземане и анализ на рибата и хранителния режим*Анализ на проби хранителния режим*

Проби от хранителните режими за изпитване и от контролните хранителни режими следва да бъдат анализирани поне в три повторения за съдържание на изпитваното вещество и на липиди най-малко преди началото на фазата на поглъщане и в края на тази фаза. Методите на анализ и процедурите за осигуряване на хомогенност на хранителния режим трябва да бъдат включени в протокола.

Пробите следва да се анализират за изпитваното вещество чрез установения и валидиран метод. Следва да се проведе предварително изследване, за да се установи границата на количествено определяне, процент на аналитичен добив, преченията и аналитичното вариране в съответната матрична проба. Ако се изпитва изотопно белязан материал, следва да се разгледат съображения, подобни на тези при метода с експозиция по воден път, като анализът на водата се заменя с анализ на фуража (вж. точка 65).

Анализ на риби

При всяко пробовземане на риби се вземат 5-10 индивида от експонираните и контролните риби (в някои случаи броят на контролните риби може да бъде намален; вж. точка 134).

Пробовземанията следва да са по едно и също време за всеки ден от опита (по отношение на времето за хранене), и следва да бъдат планирани във времето така, че вероятността за останала в червата храна по време на фазата на поглъщане и началото на фазата на почистването да е сведена до минимум, за да се предотвратят недостоверните приноси към общите концентрации на изпитваното вещество (т.е. пробовзетите риби следва да бъдат отстранени в края на даден ден от опита, като се има предвид, че денят от опита започва с момента на хранене и приключва по време на следващото хранене, приблизително 24 часа по-късно. Почистването започва с първото хранене с храна без добавка; вж. точка 128). Първата проба от фазата на почистване (взета непосредствено преди второто хранене с храна без добавка) е важно, тъй като екстраполацията обратно един ден от това измерване се използва, за да се изчисли концентрацията във времева точка нула ($C_{0,d}$, концентрацията в рибата в края на поглъщането/началото на почистването). Като вариант, стомашно-чревният тракт на рибата може да бъде отстранен и анализиран отделно в края на поглъщането и в дни 1 и 3 от почистването.

При всяко пробовземане рибите следва да бъдат отстранени от двата съда от изпитването и да се обработват по същия начин, както е описано в метода с експозиция по воден път (вж. точки 61-63).

Концентрациите на изпитваното вещество в цялата риба (мокро тегло) се измерват най-малко в края на фазата на поглъщане и по време на фазата на почистване както в контролните, така и в изпитваните групи. По време на фазата на почистване се препоръчват четири до шест точки за пробовземане (напр. 1, 3, 7, 14 и 28 дни). Като вариант може да бъде включена допълнителна точка за пробовземане след 1-3 дни поглъщане, за да се оцени ефикасността на усвояването от линейната фаза на поглъщане за рибата, докато все още е близо до началото на периода на експозиция. Съществуват две основни отклонения от графика: i) ако се използва удължена фаза на поглъщане за целите на проучването на кинетиката на поглъщането, ще има допълнителни точки за пробовземане по време на фазата на поглъщане и следователно ще е необходимо включването на допълнителни риби (вж. точка 126); ii) ако изпитването е било прекратено в края на фазата на поглъщане поради отсъствие на измеримо поглъщане (вж. точка 131). Отделните пробовзети риби следва да се претеглят (и да се измери тяхната

▼ **M7**

обща дължина) за да се даде възможност да се определят константите на скоростта на растеж. Концентрациите на веществото в специфични тъкани от риби (ядивните и неядивните части) могат също да бъдат измерени в края на поглъщането и в избрани времена от очистването. Ако се изпитва изотопно белязан материал, следва да се разгледат съображения, подобни на тези при метода с експозиция по воден път, като анализът на водата се заменя с анализ на фуража (вж. точка 65).

При периодичното използване на референтно вещество (вж. точка 25) за предпочитане е концентрациите да се измерват в изпитваната група в края на поглъщането и във всички определени за изпитваното вещество (цяла риба) времена от очистването; концентрациите трябва се анализират само в контролната група в края на поглъщането (цяла риба). При определени обстоятелства (например ако техниките за анализ за изпитваното вещество и референтното вещество са несъвместими, така че да са необходими допълнителни риби, за да се следва графикът за пробовземане) може да се използва друг подход, както следва, за да се сведе до минимум броят на изискуемите допълнителни риби. Концентрациите на референтното вещество се измерват по време на очистването само през дни 1, 3 и две следващи точки на пробовземане, избрани така, че да могат да се направят надеждни оценки за концентрацията във времева точка нула ($C_{0,d}$) и за k_2 за референтното вещество.

Ако е възможно, липидното съдържание на отделните риби се определя при всяко пробовземане, или поне в началото и в края на фазата на поглъщане и в края на фазата на очистване. (вж. точки 56 и 67). В зависимост от метода за анализ (вж. точка 67 и допълнение 4), може да е възможно използването на една и съща риба както за съдържанието на липиди, така и за определяне на концентрацията на изпитваното вещество. Това се предпочита въз основа на свеждането до минимум на броя риби. Все пак, ако това не е възможно, може да бъде използван същият подход като описания в метода с експозиция по воден път (вж. точка 56 за тези алтернативни варианти за измерване на липидите). Методът, използван за количествено определяне на съдържанието на липиди, следва да бъде документиран в протокола.

Качество на метода за анализ

Следва да бъдат извършени опитни проверки, за да се гарантира специфичността, точността, прецизността и възпроизводимостта на специфичната за веществото техника за анализ, както и аналитичният добив на изпитваното вещество както от храната, така и от рибите.

Измерване на растежа на рибите

В началото на изпитването е необходимо да бъде претеглена проба от риби от изходната популация (и следва да бъде измерена тяхната обща дължина). Тези риби трябва да бъдат пробовзети малко време преди първото подаване на храна с добавка (напр. един час), и да се разпределят в опитен ден 0. Броят на рибите за тази проба следва да е поне същият като този за пробите по време на изпитването. Някои от тях могат да са същите риби, използвани за анализ на липиди преди началото на фазата на поглъщане (вж. точка 153). При всеки интервал на пробовземане рибите най-напред се претеглят и се измерва дължината им. Измереното тегло и дължината на всяка отделна риба следва да бъдат свързани с анализираната химична концентрация (и липидно съдържание, ако е приложимо), например с помощта на уникален идентификационен код за всяка пробовзета риба. Измерванията на тези риби могат да се използват за оценка на теглото и дължината на рибите, останали в изпитваните и контролните съдове.

Оценка от опита

Следва да се извършват и записват ежедневно наблюдения на смъртността. Следва да се извършват и записват допълнителни наблюдения за неблагоприятни ефекти, например за необичайно поведение или пигментация. Рибите се смятат за умрели, ако отсъстват дихателни движения и не се установява реакция при лек механичен стимул. Всички мъртви или очевидно намиращи се в терминално състояние риби следва да бъдат отстранени.

▼ M7

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Обработка на резултатите

Резултатите от изпитването се използват за извеждане на константата за скорост на почистване (k_2) като функция на общото мокро тегло на рибата. Константата на скоростта на растежа, k_g , въз основа на средното увеличение на теглото на рибата, се изчислява и се използва за получаване на коригираната за растеж константа на скоростта на почистване, k_{2g} , ако това е целесъобразно. В допълнение следва да се протоколират ефикасността на усвояването (a ; абсорбцията в червата), кинетичният коефициент на биомултипликация (BMF_K) (при необходимост коригиран за растеж, BMF_{K_g}), неговата коригирана за липиди стойност (BMF_{KL} или $BMF_{K_{g,L}}$, ако е коригиран за понижаване на концентрацията в резултат от растеж) и скоростта на хранене. Също така, ако може да се направи оценка на времето за достигане на стационарно състояние по време на фазата на поглъщане (напр. 95 % от стационарното състояние или $t_{95} = 3,0/k_2$), може да бъде включена оценка на BMF в стационарно състояние (BMF_{SS}) (вж. точки 105 и 106 и допълнение 5), ако стойността на t_{95} показва, че може да е било достигнато стационарно състояние. За този BMF_{SS} следва да се прилага същата корекция за липиди като тази за кинетичния коефициент на биомултипликация (BMF_K), за да се даде коригирана за липиди стойност, BMF_{SSL} (следва да се отбележи, че не съществува приета процедура за корекция на BMF в стационарно състояние за понижаване на концентрацията в резултат от растеж). Формули и примерни изчисления са представени в допълнение 7. Налични са подходи, които правят възможно оценяването на кинетичния коефициент на биоконцентрация (BCF_K) въз основа на данните, получени при изследването чрез хранителния режим. Този въпрос е разгледан в допълнение 8.

Данни за теглото/обема на рибите

Мокрото тегло и дължина на отделните риби за всички времеви периоди се представят в табличен вид отделно за изпитваните и за контролните групи за всички дни за пробовземане по време на фазата на поглъщане (изходната популация за началото на поглъщането; контролна група и изпитвана група за края на поглъщането и, ако се провеждат, фаза на поглъщане на ранен етап (напр. ден 1-3 от поглъщането) и фаза на почистване (например, ден 1, 2, 4, 7, 14, 28, за контролната и изпитваната група). Теглото е предпочитаният измерител за растежа за целите на корекцията за понижаване на концентрацията в резултат от растеж. Вж. по-долу (точки 162 и 163, и допълнение 5) за метода (методите), използван за коригиране на данните за понижаване на концентрацията в резултат от растеж.

Данни за концентрацията на изпитваното вещество в рибите

Измерванията за остатъци от изпитваното вещество в отделните риби (или в обединените рибни проби, ако не са възможни измервания в отделните риби), изразени в концентрация на мокро тегло (w/w), се представят в табличен вид за изпитваните и контролните риби за отделните времена на пробовземане. Ако е направен анализ на липиди за всяка отделна пробовзета риба, отделните коригирани за липиди концентрации, като липидната концентрация (w/w липиди), могат да бъдат получени и представени в табличен вид.

- Измерванията за остатъци от изпитваното вещество в отделните риби (или в обединените рибни проби, ако не са възможни измервания в отделните риби, вж. точка 66) за периода на почистване се преобразуват в естествени логаритми и се представят графично спрямо времето (дена). Ако при визуална проверка на графиката се наблюдават очевидни стойности, силно различаващи се от нормалните, може да се приложи статистически валиден тест за стойности, силно различаващи се от нормалните, с оглед отстраняване на недоверливи точки с данни, както и документирана обосновка за тяхното пропускане.
- Изчислява се корелация с линеен метод на най-малките квадрати за данните за $\ln(\text{концентрация})$ спрямо почистването (ден). Наклонът и пресечната точка на линията се протоколират като общата константа на скоростта на почистването (k_2) и естествен логаритъм на получената концентрация във времева точка нула ($C_{0,d}$) (вж. допълнения 5 и 7 за повече подробности). Ако това не е възможно, поради това че концентрациите попадат под границата на количествено определяне за втората проба от почистването, може да се направи консервативна оценка на k_2 (вж. допълнение 7).
- Стойностите на дисперсията за наклона и пресечната точка на линията се изчисляват с използване на стандартни статистически процедури и 90- (или 95-) процентните доверителни интервали около тези резултати се оценяват и представят.

▼ M7

— Измерената средна концентрация в рибите за последния ден от поглъщането (измерена концентрация във времева точка нула, $C_{0,m}$) също се изчислява и се сравнява с получената стойност $C_{0,d}$. В случай, че получената стойност е по-ниска от измерената стойност, разликата може да предполага наличието на неразградена храна с добавка в червата. Ако получената стойност е много по-висока от измерената стойност, това може да бъде признак, че стойността, получена чрез линейна регресия от данните от пречистването, е погрешна и следва да се извърши повторна оценка (вж. допълнение 7).

Скорост на почистване и коефициент на биомултипликация

За изчисляване на коефициента на биомултипликация от данните, първо трябва да бъде получена ефикасността на усвояването (абсорбция на изпитваното вещество в червата, α). За да се направи това, следва да бъде използвано уравнение A7.1 в допълнение 7, изискващо да бъдат известни получената концентрация в рибите във времева точка нула от фазата на почистване ($C_{0,d}$), (общата) константа на скоростта на почистване (k_2), концентрацията в храната (C_{food}), константата на скоростта на поглъщане на храна (I) и продължителността на периода на поглъщане (t). Наклонът и пресечната точка на линейната зависимост между $\ln(\text{концентрация})$ и времето за почистване се протоколират като обща константа на скоростта на почистването ($k_2 = \text{наклон}$) и концентрация във времева точка нула ($C_{0,d} = e^{\text{intercept}}$), както е посочено по-горе. Получените стойности трябва да бъдат проверени за достоверност от биологична гледна точка (напр. ефикасността на усвояването като част да е не по-голяма от 1). (I) се изчислява, като се раздели масата на храната на масата на рибите, на които ежедневно се подава храна (ако храната е била равна на 2 % от телесното тегло, (I) ще е 0,02). Независимо от това, може да се наложи скоростта на хранене, използвана при изчислението, да бъде коригирана за растеж на рибите (това може да се направи, като се използва известната константа на скоростта на растеж, за да се направи оценка на теглото на рибата при всяка времева точка по време на фазата на поглъщане; вж. допълнение 7). В случаите, когато k_2 и $C_{0,d}$ не могат да бъдат получени, тъй като например концентрациите са под границата на откриване за втората проба от почистването, може да бъде направена консервативна оценка на k_2 и да се сложи „горна граница“ на BMF_k (вж. допълнение 7).

След получаването на ефикасността на усвояването (α) може да се изчисли коефициентът на биомултипликация, като се умножи α по константата на скоростта на поглъщане (I) и се раздели на (общата) константа на скоростта на почистването (k_2). Коригираният за растеж коефициент на биомултипликация се изчислява по същия начин, но с използване на коригираната за растеж константа на скоростта на почистване (k_{2g} ; вж. точки 162 и 163). Алтернативна оценка на ефикасността на усвояването може да бъде получена, ако анализът на тъканите е бил извършен върху риби, пробовзети в началния линеен етап от фазата на поглъщане; вж. точка 151 и допълнение 7). Тази стойност представлява независима оценка на ефикасността на усвояването за неекспониран като цяло организъм (т.е. рибите са близо до началото на фазата на поглъщане). Оценката на ефикасността на усвояването от данните за почистването обикновено се използва за получаване на BMF .

Корекция за липиди и корекция за понижаване на концентрацията в резултат от растеж

Растежът на рибите по време на фазата на почистване може да намали измерените химични концентрации в рибата, в резултат на което общата константа на скоростта на почистването (k_2) е по-голяма, отколкото би била само поради процесите на отстраняване (напр. метаболизъм, дефекация) (вж. точка 72). Липидното съдържание на изпитваните риби (което е силно свързано с биоаккумуляцията на хидрофобни вещества) и липидното съдържание на храните може да варира достатъчно на практика, така че тяхното коригиране е необходимо, за да се представят по смислен начин коефициентите на биомултипликация. Коефициентът на биомултипликация следва да бъде коригиран за понижаване на концентрацията в резултат от растеж (като кинетичния BCF в метода с експозиция по воден път) и за липидно съдържание в храната по отношение на рибите (коефициент на корекция за липиди). Уравнения и примери за тези изчисления могат да бъдат намерени съответно в допълнения 5 и 7.

За коригирането на понижаването на концентрацията в резултат от растеж следва да бъде изчислена коригираната за растеж константа на скоростта на

▼ **M7**

очистване (k_{2g}) (вж. допълнение 5 за уравнения). Тази коригирана за растеж константа на скоростта на очистване (k_{2g}) се използва за изчисляване на коригирания за растеж коефициент на биомултипликация, съгласно точка 73. В някои случаи този подход е невъзможен. Алтернативен подход, който заобикаля необходимостта от коригиране за понижаване на концентрацията в резултат от растеж, включва използване на масата на изпитваното вещество за риба (на база цяла риба) при очистването, вместо обичайната маса на изпитваното вещество за единица тегло на рибата (концентрация). Това може лесно да бъде постигнато, тъй като изпитванията по настоящия метод следва да свързват записаните тъканни концентрации с теглата на отделните риби. Обикновената процедурата за това е очертана в допълнение 5. Следва да се отбележи, че k_2 все пак следва да се оценява и протоколира, независимо че се използва този алтернативен подход.

С оглед да се извърши корекция за липидното съдържание в храната и рибите, когато не е извършен анализ на липидите във всички пробовзети риби, се извеждат средните липидни фракции (w/w) в рибите и в храната ⁽¹⁾. След това коефициентът на корекция за липиди (L_c) се изчислява, като се раздели средната липидна фракция в рибите на средната липидна фракция в храната. Коефициентът на биомултипликация, независимо дали е коригиран за растеж или не, както е приложимо, се разделя на коефициента на корекция за липиди, за изчисляване на коригирания за липиди коефициент на биомултипликация.

Ако химичният анализ и анализът на липидите са проведени върху едни и същи риби във всяка точка на пробовземане, тогава данните от тъканите за корекцията за липиди за отделните риби могат да се използват за пряко изчисляване на коригирания за липиди BMF (вж. (37)). Графичното представяне на коригираните за липиди данни за концентрацията дава $C_{0,d}$ на база липиди и k_2 . След това математическият анализ може да продължи, като се използват същите уравнения в допълнение 7, но ефикасността на усвояването (a) се изчислява, като се използва нормализираната за липиди константа на скоростта на поглъщане на храна (I_{lipid}) и концентрацията в хранителния режим на база липиди ($C_{food-lipid}$). След това по подобен начин коригираните за липиди параметри се използват за изчисляване на BMF (следва да се отбележи, че за изчисление на коригирания за растеж и за липиди BMF_{kgL} корекцията на константата на скоростта на растеж трябва също да се приложи към липидната фракция, а не към мокрото тегло на рибите).

Тълкуване на резултатите

Средният растеж както в изпитваните, така и в контролните групи следва по принцип да не се различава значимо, за да се изключат токсични ефекти. Константите на скоростта на растеж или кривите на растежа от двете групи следва да бъдат сравнени с подходяща процедура ⁽²⁾.

Протокол от изпитването

След завършване на изследването се изготвя окончателен протокол, съдържащ информацията за изпитваното вещество, изпитвания вид и условията на изпитване, както е посочено в точка 81 (като за метода с експозиция по воден път). Допълнително се изисква следната информация:

Изпитвано вещество:

— Всяка информация за устойчивостта на изпитваното вещество в приготвената храна;

⁽¹⁾ Този подход е специфичен за изследването чрез хранителния режим и се различава от процедурата, следвана при експозицията по воден път, оттам думата „корекция“ се използва вместо „нормализация“, за да се избегне объркване — вж. също бележка под линия в точка 106.

⁽²⁾ Може да се извърши t -тест за константите на скоростта на растеж, с цел да се тества дали се различава растежът между контролните и изпитваните групи, или F -тест в случай на анализ на дисперсията. Ако е необходимо, може да се използва F -тест или тест за правдоподобно отношение за подпомагане при избора на подходящия модел на растеж (монография 54 на ОИСР, (32)).

▼ M7*Условия на изпитване:*

- Номинална концентрация на веществото в храната, техника на добавката, количество носител (липиди), използвано в процес на добавяне към храната (ако се използва такъв), измервания на концентрациите на изпитваното вещество в хранителния режим с добавка за всеки анализ (поне в три повторения преди началото на изследването и в края на поглъщането) и средни стойности;
- Тип и качество на носещото масло или разтворител (чистота, доставчик и т.н.), използвани за добавяне към храната, ако се използват;
- Използван тип храна (анализ на Weende⁽¹⁾), чистота или качество, доставчик и др.) и скорост на хранене по време на фазата на поглъщане, количество подадена храна и честота (включително всякакви корекции въз основа на теглото на пробовзетите риби);
- Време, в което рибите са събрани и умъртвени за химичен анализ за всяка точка на пробовземане (напр. един час преди храненето на следващия ден);

Резултати:

- резултати от всякакви извършени предварителни изследвания.
- Информация за всички наблюдавани неблагоприятни ефекти;
- Пълно описание на всички използвани процедури за химичен анализ, включително границите на откриване и на количествено определяне, варирането и аналитичния добив;
- Измерените концентрации на липиди в храната (хранителен режим, с добавка и контролен), индивидуални, средни стойности и стандартни отклонения;
- Представяне в табличен вид на данните за теглото (и дължината) на рибите, свързани с отделните риби както за контролните групи, така и за експонираните групи (например, като се използват уникални идентификатори за всяка риба) и изчисления, получена константа (константи) на скоростта на растежа и 95 % доверителен интервал;
- Представяне в табличен вид на концентрацията на изпитваното вещество в рибата, измерена средна концентрация в края на поглъщането ($C_{0,m}$), и получена (общата) константа на скоростта на очистиането (k_2) и концентрацията в рибата в началото на фазата на очистиане ($C_{0,d}$) заедно с дисперсиите на тези стойности (наклон и пресечна точка);
- Представяне в табличен вид на данните за съдържанието на липиди в рибите (изброени спрямо специфичните концентрации на веществото, ако е приложимо), средни стойности за изпитвана група и контролата в началото на изпитването, края на поглъщането и края на очистиането;
- Криви (включително всички измерени данни), показващи следното (ако е приложимо, концентрациите могат да бъдат изразени по отношение на цялото тяло на животното или от определени негови тъкани):
 - растеж (т.е. дължина на рибата (и тегло) спрямо времето) или In-трансформирано тегло спрямо времето;

⁽¹⁾ Техника за анализ на храни за белтъци, липиди, сурови влакнини и пепелно съдържание; тази информация обикновено е налична от доставчика на фуража.

▼ M7

- очистването на изпитваното вещество в рибата; както и
- I_p -трансформирана концентрация (I_p концентрация) спрямо времето за очистване (включително получената константа на скоростта на очистване k_2 и концентрацията в рибите в началото на фаза на очистването, получена от естествения логаритъм, $C_{0,d}$).
- Ако при визуална проверка на графика се наблюдават очевидни стойности, силно различаващи се от нормалните, може да се приложи статистически валиден тест за стойности, силно различаващи се от нормалните, с оглед отстраняване на недостоверни точки с данни, както и документирана обосновка за тяхното пропускане.
- Изчислена коригирана за растеж константа на скоростта на очистване и коригиран за растеж период на полуразграждане.
- Изчислена ефикасност на усвояването (α).
- „Суров“ ВМФ, коригиран за липиди и за понижаване на концентрацията в резултат от растеж, кинетичен ВМФ („суров“ и коригиран за липиди на база мокро тегло на цяла риба), тъканно-специфичен ВМФ, ако е приложимо.
- Всякаква информация, отнасяща се до метаболити на изотопно белязано вещество и натрупването им.
- Всичко необичайно относно изпитването, всяко отклонение от тези процедури и всякаква друга относима информация.
- Обобщаваща таблица с относимите измерени и изчислени данни, както е по-долу:

Константи на скоростта на очистване на веществото и коефициенти на биомултипликация (ВМФ _к)	
k_g (константа на скоростта на растежа; ден ⁻¹):	Въвежда се стойност (95 % CI) ⁽¹⁾
k_2 (обща константа на скоростта на очистването, ден ⁻¹):	Въвежда се стойност (95 % CI)
k_{2g} (коригирана за растеж константа на скоростта на очистване; ден ⁻¹):	Въвежда се стойност (95 % CI) ⁽¹⁾
$C_{0,m}$ (измерена концентрация във времева точка нула, концентрацията в рибата в края на поглъщането) (µg/g):	Въвежда се стойност ± SD ⁽²⁾
$C_{0,d}$ (получена концентрация във времева точка нула, концентрацията във фазата на очистването; µg/g):	Въвежда се стойност ± SD ⁽²⁾
I (определена скорост на поглъщане на фураж; g храна/g риба/ден):	Въвежда се стойност
I_g (действителна скорост на подаване на храна, коригирана за растеж; g храна/g риба/ден) ⁽²⁾ :	Въвежда се стойност ± SD ⁽²⁾
C_{food} (концентрация на химикала в храната; µg/g):	Въвежда се стойност ± SD ⁽²⁾
α (ефикасност на усвояването на веществото):	Въвежда се стойност ± SD ⁽²⁾
ВМФ _к (кинетичен ВМФ чрез хранителния режим):	Въвежда се стойност (95 % CI) ⁽¹⁾
ВМФ _{к_g} (коригиран за растеж кинетичен ВМФ чрез хранителния режим):	Въвежда се стойност (95 % CI) ⁽¹⁾

▼ **M7**

Константи на скоростта на почистване на веществото и коефициенти на биомултипликация (BMF _K)	
$t_{1/2g}$ (коригиран за растеж период на полуразграждане в дни):	Въвежда се стойност \pm SD ⁽²⁾
L_c (коефициент на корекция за липиди):	Въвежда се стойност
BMF _{K_{GL}} (коригиран за растеж и за липиди кинетичен BMF):	Въвежда се стойност
BMF _{SS-L} (ориентировъчен коригиран за липиди BMF в стационарно състояние) ⁽²⁾ :	Въвежда се стойност \pm SD ⁽²⁾

(¹) CI: доверителен интервал (където е възможно да се оцени)
(²) SD: стандартно отклонение (където е възможно да се оцени)

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Глава В.13 от настоящото приложение, *Биоконцентрация: проточен тест върху риби.*
- (2) Глава А.6 от настоящото приложение, *Разтворимост във вода*
- (3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. *Environ Toxicol Chem* 12: 2031-2035
- (4) Глава А.8 от настоящото приложение, Коефициент на разпределение (п-октанол/вода): метод „разклащане в стъкленица“.
- (5) Глава А.24 от настоящото приложение, Коефициент на разпределение (п-октанол/вода): метод с ВЕТХ.
- (6) Глава А.23 от настоящото приложение, Коефициент на разпределение (п-октанол/вода): метод на бавно разбъркване.
- (7) Глава В.7 от настоящото приложение, Хидролиза като функция от рН.
- (8) OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (9) Глава А.5 от настоящото приложение, Повърхностно напрежение на водни разтвори.
- (10) Глава А.4 от настоящото приложение, Налягане на парите.
- (11) Глава В.4 от настоящото приложение, Пряка биологична разградимост.
- (12) Глава В.29 от настоящото приложение, Лесна биоразградимост — CO₂ в запечатани съдове
- (13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102: 117-156.
- (14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.
- (15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

▼ M7

- (16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4097-4102.
- (17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2058-2062.
- (18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicol. Sci.* 77: 206-218.
- (19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4: 139-155.
- (20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2436-2448.
- (21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. *Environmental Sciences Europe* 2012, 24:13. published: 3 April 2012.
- (22) Глава В.47 от настоящото приложение, Риби, Изпитване за токсичност на ранни етапи от жизнения цикъл.
- (23) Глава В.15 от настоящото приложение, Риби, Краткосрочно изпитване за токсичност в стадии ембриони и ларви
- (24) Глава В.14 от настоящото приложение, Изпитване за растеж на ювенилни (полово незрели) риби.
- (25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures [ENV/JM/MO-NO\(2000\)6](#). Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.
- (27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.
- (28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in *Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples*, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA
- (29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- (30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micro-method for lipids in aquatic invertebrates. *Limnol. Oceanogr.* 30: 1099-1105.
- (31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst.* 124: 1711-1718.
- (32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. [ENV/JM/MO-NO\(2006\)18](#). Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼ M7

- (33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.
- (34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.
- (35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.
- (37) Fisk A.T., Cymbalisky C.D., Bergman Å. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C₁₂- and C₁₆-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1775-1782.
- (38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study — Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, *Toxicol. Environ. Chem.* 7: 173-189.
- (41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. *Chemosphere.* 14: 829-833.
- (42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
- (43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. *Toxicol. Sci.* 77: 219-229.
- (44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5: 624-637.
- (45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2769-2777.
- (46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisky C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 951-961.
- (48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2503-2517.
- (49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

▼M7

- (50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. *Environ. Sci. Technol.* 27: 1718-1728.
- (51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I — Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II — Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼ M7

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Ефикасността на усвояването (α) е измерител за относителното количество вещество, абсорбирано от червата в организма (α е безразмерна, но често се изразява като процент, а не като фракция).

Биоаккумуляцията обикновено се определя като процес, в който концентрацията на веществото в организма достига ниво, което надвишава тази в дихателната среда (напр. вода за дадена риба или въздух за даден бозайник), хранителния режим, или и двете (1).

Биоконцентрацията е увеличението в концентрацията на изпитваното вещество във или върху организъм (или определени негови тъкани), отнесено към концентрацията на изпитваното вещество в заобикалящата среда.

Коефициентът на биоконцентрация (BCF или K_B) по всяко време от фазата на поглъщане в това изпитване за акумулация е концентрацията на изпитваното вещество във/върху рибата или определени нейни тъкани (C_f като mg/kg), разделена на концентрацията на веществото в заобикалящата среда (C_w като mg/l). BCF се изразява в $l \cdot kg^{-1}$. Следва да се има предвид, че корекциите за растеж и/или стандартното съдържание на липиди не се отчитат.

Биомултипликацията е увеличението в концентрацията на изпитваното вещество във или върху организъм (или определени негови тъкани), отнесено към концентрацията на изпитваното вещество в храната.

Коефициентът на биомултипликация (BMF) представлява концентрацията на дадено вещество в хищник, отнесено към концентрацията в плячката на хищника (или в храната) при стационарно състояние. В метода, описан в настоящия метод за изпитване, експозицията във водна фаза внимателно се избягва и следователно стойността на BMF от настоящия метод за изпитване не може да бъде пряко сравнявана със стойност на BMF от проучване на място (в което може да се комбинират експозиция както по воден път, така и чрез хранителния режим).

Коефициентът на биомултипликация от експозиция чрез хранителния режим (BMF чрез хранителния режим) е термин, използван в настоящия метод за изпитване за описване на резултата от експозиция чрез хранителния режим, при която внимателно се избягва експозиция във водна фаза и следователно BMF чрез хранителния режим от настоящия метод за изпитване не може да бъде пряко сравняван със стойност на BMF от проучване на място (в което може да се комбинират експозиция както по воден път, така и чрез хранителния режим).

Фазата на очистването, или след излагането (загуба) е времето, което следва след прехвърлянето на изпитваните риби от среда, съдържаща изпитвано вещество, към среда, в която отсъства такова вещество, през което време се изследва очистването (или нетната загуба) на веществото от изпитваните риби (или определени техни тъкани).

Константата на скоростта на очистването (загубата) (k_2) е числената стойност, определяща скоростта на намаляване на концентрацията на изпитваното вещество в изпитваната риба (или определени нейни тъкани), след прехвърлянето на изпитваната риба от среда, съдържаща изпитваното вещество, към среда, несъдържаща такова вещество (k_2 се изразява в $ден^{-1}$).

Разтворен органичен въглерод (DOC) е измерител за концентрацията на въглерод с произход от разтворени органични източници в средата за изпитване.

Фазата на експозиция или фазата на поглъщане е времето, през което рибите са изложени на въздействието на изпитваното вещество.

Скоростта на поглъщане на храна (I) е средната стойност на храната, консумирана от всяка риба всеки ден, спрямо оценката за средното тегло на цялото тяло на рибата (изразено в g храна/g риба/ден).

▼ M7

Кинетичният коефициент на биоконцентрация (BCF_K) е отношението на константата на скоростта на поглъщане, k_1 , към константата на скоростта на почистване, k_2 (т.е. k_1/k_2 — вж. съответните определения в настоящото допълнение). По принцип стойността следва да бъде сравнима със BCF_{SS} (вж. определението по-горе), но може да има отклонения, ако стационарното състояние е било несигурно или ако са били приложени корекции за растеж спрямо кинетичния BCF.

Кинетичният коефициент на биоконцентрация с нормализация за липиди (BCF_{KL}) се нормализира към риба с 5 % съдържание на липиди.

Коригираният за растеж кинетичен коефициент на биоконцентрация с нормализация за липиди (BCF_{KGL}) се нормализира към риба с 5 % съдържание на липиди и се коригира за растеж по време на периода на изследване, както е описано в допълнение 5.

Коефициентът на биоконцентрация в стационарно състояние с нормализация за липиди (BCF_{SSL}) се нормализира към риба с 5 % съдържание на липиди.

Вещество с повече съставки за целите на REACH се определя като вещество, което има повече от една основна съставка в концентрация между 10 % и 80 % (w/w).

Коефициентът на разпределение октанол-вода (K_{OW}) е съотношението на разтворимостта на веществото в *n*-октанол и вода при достигнато равновесие (Методи А.8 (2), А.24 (3), А.23 (4)); понякога изразяван също като P_{OW} . Логаритъмът от K_{OW} се използва като индикация за потенциала на веществото за биоконцентрация при водни организми.

Органичният въглерод под формата на твърди частици (POC) е измерител за концентрацията на въглерода с произход от суспендирани органични източници в средата за изпитване.

Твърдофазната микроекстракция (SPME) е техника за анализ без разтворител, разработен за разреждени системи. При този метод влакна с полимерно покритие се експонират на газова или течна фаза, съдържаща представляващия интерес аналит. Като цяло се налага минимално време за анализ, така че да се достигне равновесие между твърдата и течната фаза, по отношение на измервания животински вид. Впоследствие концентрацията на представляващия интерес аналит може да бъде определена пряко от влакната или след извличането му от влакната в разтворител, в зависимост от техниката на определяне.

Стационарното състояние се достига на графиката на изпитваното вещество в рибата (C_f) спрямо времето, когато кривата стане успоредна на времевата ос и три последователни анализа на C_f направени върху проби, взети на интервали от поне два дни, не се отличават с повече от ± 20 % един от друг, и няма значимо увеличение на C_f във времето между първия и последния от последователните анализи. Когато се анализират обединени проби, са необходими поне четири успешни анализа. За изпитвани вещества, които се усвояват бавно, е по-подходящо интервалите да бъдат по седем дни.

Коефициентът на биоконцентрация в стационарно състояние (BCF_{SS}) не се променя значимо за дълъг период от време, като концентрацията на изпитваното вещество в заобикалящата среда през този период е постоянна (вж. определението за стационарно състояние).

Общият органичен въглерод (TOC) е измерител за концентрацията на въглерода с произход от всички органични източници в средата за изпитване, включително твърди частици и разтворени източници.

Константата на скоростта на поглъщане (k_1) е числената стойност, определяща скоростта на нарастване на концентрацията на изпитваното вещество във/върху рибите, подложени на изпитване (или определени техни тъкани), когато рибите са експонирани на това вещество (k_1 се изразява в $l\text{ kg}^{-1}\text{ ден}^{-1}$).

Веществата с непознат или променлив състав, сложните продукти от реакции или биологичните материали са познати като UVCB.

▼ M7

Химикал означава вещество или смес.

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

LITERATURE

- (1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.
- (2) Глава А.8 от настоящото приложение, *Коефициент на разпределение (n-октанол/вода): метод „разклащане в стъкленица“*
- (3) Глава А.24 от настоящото приложение, *Коефициент на разпределение (n-октанол/вода): метод с ВЕТХ.*
- (4) Глава А.23 от настоящото приложение, *Коефициент на разпределение (n-октанол/вода): метод на бавно разбъркване.*

▼ M7

Допълнение 2

**НЯКОИ ХИМИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПРИЕМЛИВА ВОДА
ЗА РАЗРЕЖДАНЕ**

Компонент	Гранична концентрация
Твърди частици	5 mg/l
Общ органичен въглерод	2 mg/l
Нейонизиран амоняк	1 µg/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
Алуминий	1 µg/l
Арсен	1 µg/l
Хром	1 µg/l
Кобалт	1 µg/l
Мед	1 µg/l
Желязо	1 µg/l
Олово	1 µg/l
Никел	1 µg/l
Цинк	1 µg/l
Кадмий	100 ng/l
Живак	100 ng/l
Сребро	100 ng/l

▼ M7

Допълнение 3

ВИДОВЕ РИБИ, КОИТО СЕ ПРЕПОРЪЧВАТ ЗА ИЗПИТВАНЕ

Препоръчани видове	Препоръчан обхват от температури за изпитване (°C)	Препоръчвана обща дължина на изпитваното животно (cm) ⁽²⁾
Danio rerio ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) Риба зебра (Hamilton-Buchanan)	20 – 25	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Pimephales promelas	20 – 25	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Шаран	20 – 25	8,0 ± 4,0 ⁽³⁾
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) Японска оризия	20 – 25	4,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Гупи	20 – 25	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) Слънчева риба	20 – 25	5,0 ± 2,0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Дъгова пъстърва	13 – 17	8,0 ± 4,0
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Триигла бодливка	18 – 20	3,0 ± 1,0

⁽¹⁾ Meyer *et al.* (1)

⁽²⁾ Следва да се отбележи, че в самото изпитване теглото се предпочита като измерител за получаване на размера и константата на скоростта на растежа. Въпреки това се признава, че дължината е по-практичен измерител, ако рибите трябва да бъдат избрани визуално в началото на даден опит (т.е. от изходната популация).

⁽³⁾ Този обхват от дължини е посочен в Методите за изпитване за откриване на нови химични вещества и др. въз основа на японския Закон за контрол на химическите вещества (CSCL).

Различни естуарни и морски видове са били използвани в по-малка степен, например:

Петнист крокър	(<i>Leiostomus xanthurus</i>)
Cyprinodon variegatus	(<i>Cyprinodon variegatus</i>)
Атерина	(<i>Menidia beryllina</i>)
Cumatogaster aggregata	(<i>Cumatogaster aggregata</i>)
Морски език	(<i>Parophrys vetulus</i>)
Leptocottus armatus	(<i>Leptocottus armatus</i>)
Триигла бодливка	(<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
Лаврак	(<i>Dicentracus labrax</i>)
Уклей	(<i>Alburnus alburnus</i>)

▼M7

Пресноводните риби, изброени в горната таблица, са лесни за отглеждане и/или са широко достъпни през цялата година, докато наличността на морските и естуарните видове е частично ограничено до съответните страни. Тези риби могат да бъдат развъждани и култивирани било в рибни ферми или лабораторно, при условия на контрол върху болести и паразити, така че тестовите животни да са здрави и с познат произход. Тези риби се намират в много части на света.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.

▼ M7

Допълнение 4

ГРАФИЦИ ЗА ПРОБОВЗЕМАНЕ ЗА ИЗПИТВАНИЯ С
ЕКСПОЗИЦИИ ПО ВОДЕН ПЪТ И ЧРЕЗ ХРАНИТЕЛНИЯ РЕЖИМ

1. Теоретичен пример за график за пробовземане за цялостно изпитване на биоконцентрация с експозиция по воден път за вещество с $\log K_{OW} = 4$.

Пробовземане на риби	Времеви график за пробовземане		Брой на пробите вода ⁽¹⁾	Брой на рибите за проба ⁽¹⁾
	Минимална изисквана честота (дни) ⁽²⁾	Допълнително пробовземане (дни) ⁽²⁾		
Фаза на поглъщане				
1	- 1		2 ⁽³⁾	4 ⁽⁴⁾
	0		2)	(3 ⁽⁶⁾)
2	0,3		2	4
		0,4	2)	4)
3	0,6		2	4
		0,9	2)	4)
4	1,2		2	4
		1,7	2)	4)
5	2,4		2	4
		3,3	2)	4)
6	4,7		2	4 – 8 ⁽⁵⁾
				(3 ⁽⁶⁾)
Фаза на очистване				Рибите се прехвърлят във вода без изпитваното вещество
7	5,0		2	4
		5,3		4)
8	5,9		2	4
		7,0		4)
9	9,3		2	4
		11,2		4)
10	14,0		2	4 – 8 ⁽⁵⁾
		17,5		(4 + 3 ⁽⁶⁾)
ОБЩО				40 – 72 (48 – 80) ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Стойностите в скобите са броят на пробите (вода, риба), които трябва да се вземат, ако се прави допълнително пробовземане.

⁽²⁾ Оценката на k_2 преди изпитването при $\log K_{OW}$ от 4,0 е 0,652 дни⁻¹. Общата продължителност на опита е определена на $3 \times t_{SS} = 3 \times 4,6$ дни, т.е. 14 дни. За оценка на t_{SS} се прави препратка към допълнение 5.

⁽³⁾ Вода се пробовзема след минимум три прехвърляния на обема на камерата.

⁽⁴⁾ Тези риби се пробовземат от изходната популация.

⁽⁵⁾ Ако са необходими изследвания с по-висока точност или за метаболизъм, които изискват повече риби, те следва да бъдат включени в извадката и по-специално пробовзети в края на фазите на поглъщане и очистване (вж. точка 40).

⁽⁶⁾ Може да се изискват най-малко 3 допълнителни риби за извършване на анализ за съдържание на липиди, ако не е възможно да се използват същите риби, пробовзети за концентрации на веществото в началото на изпитването, в края на фазата на поглъщане и в края на фазата на очистване. Следва се отбележи, че в много случаи трябва да е възможно да се използват само 3-те контролни риби (вж. точка 56).

▼ M7

2. Теоретичен пример за график за пробовземане за изпитване за биоаккумуляция с експозиция чрез хранителния режим за вещество след фаза на поглъщане от 10 дни и фаза на очистване от 42 дни.

Пробовземане	Времени график за пробовземане		Брой проби от храна	Брой на рибите за проба	
	Ден от фаза	Допълнителни рибни проби?		Изпитвана група	Контролна група
Фаза на поглъщане					
1	0	Възможно ⁽¹⁾ ⁽²⁾	3 — изпитвана група	0	5 – 10
			3 — контролна група ⁽¹⁾		(8 – 13) ⁽²⁾
1A ⁽³⁾	1-3			5 – 10	5 – 10
2	10	Да ⁽⁴⁾	3 — изпитвана група	10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
			3 — контролна група ⁽¹⁾	(13 – 18) ⁽⁵⁾	(8 – 13) ⁽⁵⁾
Фаза на очистване					
3	1	Да ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
4	2			5 – 10	5 – 10
5	4			5 – 10	5 – 10
6	7	Да ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
7	14			5 – 10	5 – 10
8	28			5 – 10	5 – 10
9	42	Да ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾ (13 – 18) ⁽⁵⁾	5 – 10 (8 – 13) ⁽⁵⁾
ОБЩО				59 – 120 (63 – 126) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾	50 – 110 (56 – 116) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ 3 проби от фуражи както от контролните, така и от изпитваните групи, анализирани за концентрации на изпитваното вещество и за съдържание на липиди.

⁽²⁾ рибите се пробовземат от изходната популация колкото е възможно по-близо до началото на изследването; за съдържание на липиди трябва да бъдат пробовзети най-малко 3 риби от изходната популация в началото на изпитването.

⁽³⁾ пробовземането (по избор) на ранен етап от фазата на поглъщането е източник на данни за изчисляване на усвояването на хранителния режим с изпитваното вещество, което може да бъде сравнено с ефикасността на усвояването, изчислена от данните от фазата на очистването.

⁽⁴⁾ 5 допълнителни риби могат да бъдат пробовзети за тъканно-специфичен анализ.

⁽⁵⁾ Може да се изискват най-малко 3 допълнителни риби за извършване на анализ за съдържание на липиди, ако не е възможно да се използват същите риби, пробовзети за концентрации на веществото в началото на изпитването, в края на фазата на поглъщане и в края на фазата на очистване. Следва се отбележи, че в много случаи трябва да е възможно да се използват само 3-те контролни риби (вж. точки 56 и 153).

Забележка относно времето за фазите и пробовземанията: Фазата на поглъщане започва с първото подаване на храна с хранителен режим с добавка. За ден от опита се смята от дадено подаване на храна до малко преди следващото подаване на храна, 24 часа по-късно. Първото пробовземане (1 в таблицата) следва да се извърши малко преди първото подаване на храна (например, един час). Пробовземането по време на изследването следва в идеалния случай да се извършва малко преди подаването на храна на следващия ден (т.е. около 23 часа след последното подаване на храна). Фазата на поглъщане приключва малко преди първото подаване на храна с хранителен режим без добавка, когато започва фазата на очистването рибата (изпитвана група риби вероятно все още смилат фуража с добавка през междинните 24 часа след последното подаване на храна с хранителен режим с добавка). Това означава, че пробата в края на поглъщането следва да се вземе малко преди първото подаване на храна с хранителен режим без добавка, а първата проба от фазата на очистването следва да се вземе около 23 часа след първото подаване на храна с хранителен режим без добавка.

▼ M7

Допълнение 5

ОБЩИ ИЗЧИСЛЕНИЯ

1. Въведение
2. Прогнозна оценка за продължителността на фазата на поглъщане
3. Прогнозна оценка за продължителността на фазата на очистване
4. Последователен метод: определяне на константата на скоростта на *очистване* (загуба) k_2
5. Последователен метод: определяне на *константата* на скоростта на поглъщане k_1 (само за метода с експозиция по воден път)
6. Едновременен метод за изчисляване на константите на скоростта на поглъщане и очистване (загуба) (само за метода с експозиция по воден път)
7. Корекцията за понижаване на концентрацията в резултат от растеж за кинетичния BCF и BMF
8. Нормализация за липиди към 5 % съдържание на липиди (само за метода с експозиция по воден път)

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Общия модел на биоаккумуляцията по воден път в риби може да се опише по отношение на процесите на поглъщане и на загуба, като се игнорира поглъщането с храната. Диференциалното уравнение (dC_f/dt), описващо скоростта на промяна в концентрацията в рибата ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ден}^{-1}$) се получава по (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{Уравнение A5.1}]$$

където:

k_1 = Константа на скоростта на поглъщане в рибата от първи порядък ($\text{l} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ден}^{-1}$).

k_2 = Константа на скоростта на очистване от рибата от първи порядък (ден^{-1}).

k_g = Константа на скоростта на растеж на рибата от първи порядък („понижаване на концентрацията в резултат от растеж“) (ден^{-1}).

k_m = Константа на скоростта на метаболитна трансформация от първи порядък (ден^{-1}).

k_e = Константа на скоростта на елиминиране чрез дефекация от първи порядък (day^{-1}).

C_w = Концентрация във вода ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$).

C_f = Концентрация в риба ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ мокро тегло).

За биоакмулиращи вещества може да се очаква, че средно претеглената във времето (TWA) е най-относимата концентрацията при експозиция във водата (C_w) в рамките на позволения обхват на колебания (вж. точка 24). Препоръчително е да се изчисли средно претеглената във времето концентрация във вода, съгласно процедурата в допълнение 6 от метод за изпитване B.20 (2). Следва да се отбележи, че In-трансформацията на концентрацията във вода е подходяща, когато се очаква експоненциално намаляване между периодите на обновяване, напр. при планиране на полустатично изпитване. При проточна система In-трансформация на концентрациите на експозиция може да не е необходима. Ако са получени, средно претеглените във времето концентрации във вода следва да бъдат протоколирани и използвани за последващи изчисления.

В стандартно изпитване за BCF в риби поглъщането и очистването могат да се опишат по отношение на два процеса с кинетика от първи порядък.

▼ **M7**

$$\text{Скорост на поглъщане} = k_1 \times C_w \quad [\text{Уравнение A5.2}]$$

$$\text{Обща скорост на почистване} = (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{Уравнение A5.3}]$$

При стационарно състояние, като се допуска, че растежът и метаболизъмът са незначителни (т.е. стойностите за k_g и k_m не могат да бъдат разграничени от нула), скоростта на поглъщането е равна на скоростта на почистването, така че съчетаването на уравнения A5.2 и A5.3 дава следната зависимост:

$$BCF = \frac{C_f - SS}{C_w - SS} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Уравнение A5.4}]$$

където

$$C_{f-SS} = \text{Концентрация в риби при стационарно състояние (mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ мокро тегло).}$$

$$C_{w-SS} = \text{Концентрация във вода при стационарно състояние (mg l}^{-1}\text{).}$$

Отношението k_1/k_2 е известно като кинетичен BCF (BCF_K) и следва да бъде равно на BCF в стационарно състояние (BCF_{SS}), получен от отношението на концентрацията в стационарно състояние в риби към това във вода, но може да има отклонения, ако стационарното състояние е било несигурно или ако са били приложени корекции за растеж спрямо кинетичния BCF. Независимо от това, тъй като k_1 и k_2 са константи, за получаване на BCF_K не е нужно да се достига стационарно състояние.

Въз основа на тези уравнения от първи порядък, настоящото допълнение 5 включва общите изчисления, необходими за методите с биоаккумуляция с експозиция както по воден път, така и чрез хранителния режим. Независимо от това, раздели 5, 6 и 8 се отнасят само за метода с експозиция както по воден път, но са включени тук, тъй като са „общи“ техники. Последователните (раздели 4 и 5) и едновременните (раздел 6) методи позволяват изчисляването на константите на поглъщане и почистване, които се използват за получаване на кинетичните BCF. Последователният метод за определяне на k_2 (раздел 4) е важен за метода чрез хранителния режим, тъй като е необходим, за да се изчислят както ефикасността на усвояването, така и ВМФ. Допълнение 7 описва подробно изчисленията, които са специфични за метода чрез хранителния режим.

2. ПРОГНОЗНА ОЦЕНКА ЗА ПРОДЪЛЖИТЕЛНОСТТА НА ФАЗАТА НА ПОГЛЪЩАНЕ

Преди извършването на изпитването може да се получи оценка на k_2 и оттам някакъв процент от времето, необходимо за достигане на стационарно състояние, може да се получи от емпиричните зависимости между k_2 и коефициента на разпределение *n*-октанол/вода (K_{OW}), или между k_1 и BCF. Следва да се отбележи обаче, че уравненията в настоящия раздел се прилагат само когато поглъщането и почистването следват кинетика от първи порядък. Ако е очевидно, че случаят не е такъв, препоръчително е да се търси консултация от статистик в областта на биологията и/или специалист в областта на фармакокинетиката, ако прогнозните оценки за фазата на поглъщане са желателни.

Оценката за k_2 (ден⁻¹) може да се получи по няколко начина. Например, на първо място могат да се използват следните емпирични зависимости⁽¹⁾:

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \log K_{OW} \quad (r^2 = 0,95) \quad [(3); \text{Уравнение A5.5}]$$

или

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF} \quad [\text{Уравнение A5.6}]$$

$$\text{Където } k_1 = 520 \times W^{-0,32} \text{ (за вещества с } \log K_{OW} > 3) \quad (r^2 = 0,85) \quad [(4); \text{Уравнение A5.7}]$$

⁽¹⁾ Както при всяка емпирична зависимост, следва да се провери дали изпитваното вещество попада в приложното поле на зависимостта

▼ M7

$$IBCF = 10^{(0,910 \cdot \log K_{ow} - 1,975 \cdot \log(6,8 \cdot 10^{-7} K_{ow} + 1) - 0,786)} \quad (r^2 = 0,90) \quad [(5); \text{ [Уравнение A5.8]}]$$

W = средно тегло на третирана риба (грамове мокро тегло) в края на поглъщането/началото на почистването ⁽¹⁾

За други свързани зависимости вж. (6). Може да се окаже полезно да се използват по-сложни модели за оценката на k_2 , ако например има вероятност от поява на значим метаболизъм (7) (8). Независимо от това, тъй като сложността на модела нараства, следва да се обърне по-голямо внимание на тълкуването на прогнозните оценки. Например присъствието на нитрогрупи би могло да е признак за бърз метаболизъм, но това не винаги е така. Поради това при определянето на графика на дадено изследване потребителят следва да съпостави резултатите от прогнозния метод с химичната структура и всякаква друга относима информация (например предварителни изследвания).

Времето за достигане на определен процент от стационарното състояние може да се получи чрез прилагане на оценката за k_2 , от общото кинетично уравнение, описващо поглъщането и почистването (кинетика от първи порядък), като се допуска, че растежът и метаболизмът са незначителни. Ако по време на изследването има значителен растеж, описаните по-долу оценки няма да са надеждни. В такива случаи е по-добре да се използва коригираната за растеж k_{2g} , както е описано по-нататък (вж. раздел 7 от настоящото допълнение):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f \quad [\text{Уравнение A5.9}]$$

или, ако C_w е константа:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Уравнение A5.10}]$$

Когато се наближи стационарното състояние ($t \rightarrow \infty$), уравнение A5.10 може да се съкрати (вж. (9) (10)) до:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad [\text{Уравнение A5.11}]$$

или

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \quad [\text{Уравнение A5.12}]$$

Тогава $BCF \times C_w$ е приближение на концентрацията в рибата при стационарно състояние ($C_{f,SS}$). [Забележка: същият подход може да се използва при оценка на BMF в стационарно състояние с изпитването чрез хранителния режим. В този случай в уравненията по-горе BCF се заменя с BMF, а C_w с C_{food} , концентрация в храната]

Уравнение A5.10 може да се напише така:

$$C_f = C_{f-SS} (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Уравнение A5.13}]$$

или

$$\frac{C_f}{C_{f-SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Уравнение A5.15}]$$

Като приложим уравнение A5.14, може да се направи прогнозна оценка на времето за достигане на определен процент от стационарното състояние, когато е направена предварителна оценка на k_2 с помощта на уравнения A5.5 или A5.6.

Като насока, статистически оптималната продължителност на фазата на поглъщане за получаване на статистически приемливи данни (BCF_K) е онзи период, който се изисква за кривата на логаритъма на концентрацията

⁽¹⁾ Теглото на рибата в края на фазата на поглъщане може да се оцени от данни от предходно изследване или от знания за увеличаването на размерите на изпитвания животински вид от началното тегло при типично изпитване за типична продължителност на поглъщането (напр. 28 дни).

▼ M7

на изпитваното вещество в рибата, начертана спрямо линейното време за достигане на минимум 50 % от стационарното състояние (т.е. $0,69/k_2$), но не повече от 95 % от стационарното състояние (т.е. $3,0/k_2$) (11). В случай че акумулацията достигне стойност над 95 % от стационарното състояние, става възможно изчисляването на BCF_{SS} .

Времето за достигане на 80 процента от стационарното състояние (като се използва уравнение A5.14) е:

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Уравнение A5.16}]$$

или

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \quad [\text{Уравнение A5.17}]$$

По подобен начин, времето за достигане на 95 процента от стационарното състояние е:

$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \quad [\text{Уравнение A5.18}]$$

Например, продължителността на фазата на поглъщане (т.е. времето за достигане на определен процент от стационарното състояние, например t_{80} или t_{95}) за изпитвано вещество с $\log K_{OW} = 4$ ще бъде (използвайки уравнения A5.5, A5.16 и A5.17):

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ ден}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45 \text{ days}(59 \text{ hours})$$

$$\text{или } t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60 \text{ days}(110 \text{ hours})$$

Алтернативно изразът:

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55,31 \text{ (hours)} \quad [\text{Уравнение A5.18}]$$

може да се използва за изчисляване на времето за достигане на действително стационарно състояние (t_{eSS}) (12). За изпитвано вещество с $\log K_{OW} = 4$ това води до:

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55,31 = 121 \text{ hours}$$

3. ПРОГНОЗНА ОЦЕНКА ЗА ПРОДЪЛЖИТЕЛНОСТТА НА ФАЗАТА НА ОЧИСТВАНЕ

Прогнозна оценка за времето, необходимо за намаляване на погълнатото вещество в тялото до определен процент от първоначалната концентрация, може също да се получи от общото уравнение, описващо поглъщането и очистиането (като се допуска кинетика от първи порядък, вж. уравнение A5.9 (1) (13).

За фазата на очистиането се допуска, че C_w (или C_{food} за изпитването с експозиция чрез хранителния режим) е нула. Следователно уравнението може да се съкрати до:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \quad [\text{Уравнение A5.20}]$$

или

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad [\text{Уравнение A5.21}]$$

където $C_{f,0}$ е концентрацията при началото на периода на очистиането.

Тогава 50 % очистиане ще се достигне за времето (t_{50}):

▼ M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

или

$$t_{50} = \frac{-\ln(0,50)}{k_2} = \frac{0,693}{k_2}$$

По подобен начин 95 процента очистиране ще се достигне при:

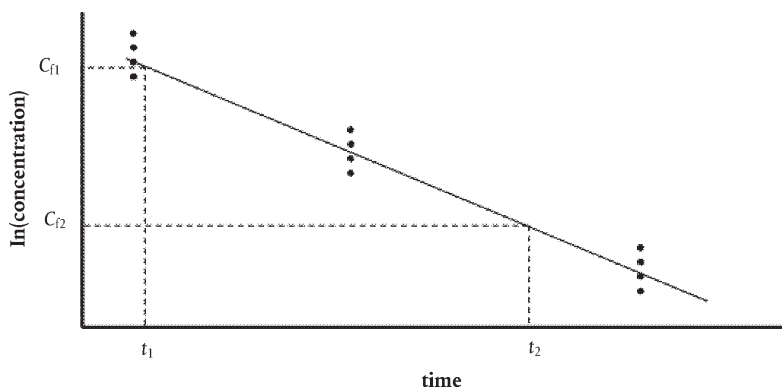
$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2}$$

Ако 80 % поглъщане се използва за първия период ($1,6/k_2$) и 95 % загуба при фазата на очистирането ($3,0/k_2$), тогава фазата на очистирането е приблизително два пъти продължителността на фазата на поглъщането.

Следва да се отбележи, че оценките са базирани на допускането, че моделите на поглъщане и очистиране ще следват кинетика от първи порядък. Ако е очевидно, че не се спазва кинетика от първи порядък, тези оценки не са валидни.

4. ПОСЛЕДОВАТЕЛЕН МЕТОД: ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КОНСТАНТАТА НА СКОРОСТТА НА ОЧИСТВАНЕ (ЗАГУБА) k_2

За повечето данни за биоконцентрация се допуска, че са сравнително добре описани чрез прост модел с два компартмента/два параметъра, както е показано чрез правата линия на графиката, която апроксимира точките за концентрация в рибата (върху ln-скала) по време на фазата на очистирането.



Следва да се отбележи, че отклоненията от правата линия може да означават модел за очистиране, който е по-сложен от кинетиката от първи порядък. За типовете очистиране, отклоняващи се от кинетиката от първи порядък, може да се приложи графичният метод.

За изчисление на k_2 за множество времеви точки (точки на пробовземане) се извършва линейна регресия на ln(концентрацията) спрямо времето. Наклонът на регресионната линия е оценка за константата на скоростта на очистиране k_2 ⁽¹⁾. Концентрация в рибата в началото на фазата на очистирането ($C_{0,d}$; която се равнява на средната концентрация в рибата в края на фазата на поглъщане) може лесно да бъде изчислена от пресечната точка (включително границите на грешката)⁽¹⁾:

⁽¹⁾ В повечето програми, които позволяват линейна регресия, са дадени също така стандартни грешки и доверителен интервал (CI) за оценките, напр. в Microsoft Excel с помощта на пакета с инструменти за анализ на данни.

▼ **M7**

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}} \quad [\text{Уравнение A5.21}]$$

За изчисление на k_2 , когато са налични само две времеви точки (точки на пробовземане) (както при сведения до минимум план), двете средни концентрации се заместват в следното уравнение

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \quad [\text{Уравнение A5.23}]$$

където $\ln(C_{f1})$ и $\ln(C_{f2})$ са естествените логаритми на концентрациите съответно във времена t_1 и t_2 , а t_2 и t_1 са времената, когато двете проби са взети, отнесени към началото на очистването⁽¹⁾.

5. ПОСЛЕДОВАТЕЛЕН МЕТОД: ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КОНСТАНТАТА НА СКОРОСТТА НА ПОГЛЪЩАНЕ K_1 (САМО ЗА МЕТОДА С ЕКСПОЗИЦИЯ ПО ВОДЕН ПЪТ)

За да се намери стойност на k_1 при наличие на набор от последователни данни за концентрацията във времето за фазата на поглъщане, се използва компютърна програма за апроксимиране на следния модел:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Уравнение A5.24}]$$

където k_2 е дадена от предходното изчисление, $C_f(t)$ и $C_w(t)$ са съответно концентрациите в рибата и във водата във време t .

За изчисление на k_1 когато са налични само две времеви точки (точки на пробовземане) (както при сведения до минимум план), се използва следната формула

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{Уравнение A5.24}]$$

където k_2 е дадена от предходното изчисление, C_f е концентрацията в рибата в началото на фазата на очистването, а C_w е средната концентрация във водата по време на фазата на поглъщане⁽²⁾.

За оценка на пригодността може да се използва визуална проверка на наклона на k_1 и k_2 , след начертаване спрямо данните от измерванията в точки на пробовземане. Ако се окаже, че последователният метод е дал непригодна оценка за k_1 , тогава за изчисление на k_1 и k_2 следва да се приложи едновременният подход (вж. следващия раздел 6). Отново, полученият наклон следва да бъде сравняван спрямо начертаните измерени данни за визуална проверка на пригодността. Ако пригодността все още не е достатъчна, това може да бъде признак, че не се прилага кинетика от първи порядък и следва да се използват други сложни модели.

6. ЕДНОВРЕМЕНЕН МЕТОД ЗА ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА КОНСТАНТИТЕ НА СКОРОСТТА НА ПОГЛЪЩАНЕ И ОЧИСТВАНЕ (ЗАГУБА) (САМО ЗА МЕТОДА С ЕКСПОЗИЦИЯ ПО ВОДЕН ПЪТ)

Могат да бъдат използвани компютърни програми за намиране на стойностите на k_1 и k_2 при наличие на набор от последователни данни за концентрацията във времето, по модела:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{Уравнение A5.25}]$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [\text{Уравнение A5.26}]$$

където

t_c = време в края на фазата на поглъщане.

Този подход пряко дава стандартните грешки за оценките на k_1 и k_2 . Когато k_1/k_2 е заместено с BCF (вж. уравнение A5.4) в уравнения A5.25

⁽¹⁾ За разлика от метода с линейна регресия, когато се използва тази формула, не се дава стандартна грешка за k_2 .

⁽²⁾ За разлика от процедурата с линейна апроксимация, този метод обикновено не дава стандартна грешка или доверителен интервал за оценката за k_1 .

▼ M7

и A5.26, стандартната грешка и 95 % CI на BCF също могат да бъдат оценени. Това е особено полезно при сравняването на различни оценки вследствие на трансформация на данните. Зависимата променлива (концентрацията в рибата) може да бъде апроксимирана с ln-трансформация или без нея, и произтичащата неопределеност на BCF може да бъде оценена.

Тъй като съществува силна корелация между двата параметъра k_1 и k_2 , ако се оценят едновременно, може да е препоръчително първо да се изчисли k_2 само от данните за очистването (вж. по-горе); k_2 в повечето случаи може да се изчисли с относително висока прецизност от кривата на очистването. Впоследствие k_1 може бъде изчислена от данните за поглъщането чрез нелинейна регресия⁽¹⁾. Препоръчително е да се използва същата трансформация на данни, когато се прилага последователно изглаждане.

За оценка на пригодността може да се използва визуална проверка на получените наклони, след начертване спрямо данните от измерванията в точките на пробовземане. Ако се окаже, че този метод е дал непригодна оценка за k_1 , тогава за изчисление на k_1 и k_2 може да се приложи едновременният подход. Отново, изгладеният модел следва да бъде сравнен с начертаните измерени данни за визуална проверка на пригодността, и получените параметрични оценки за k_1 , k_2 и получения BCF и техните стандартни грешки и/или доверителни интервали следва да бъдат съпоставени между различните типове апроксимация.

Ако пригодността не е достатъчна, това може да бъде признак, че не се прилага кинетика от първи порядък и следва да се използват други по-сложни модели. Едно от най-често срещаните усложнения е растежът на рибите по време на изпитването.

7. КОРЕКЦИЯТА ЗА ПОНИЖАВАНЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЯТА В РЕЗУЛТАТ ОТ РАСТЕЖ ЗА КИНЕТИЧНИЯ BCF И VMF

В настоящия раздел е описан стандартен метод за корекция поради растеж на рибите по време на изпитването (т.нар. „понижаване на концентрацията в резултат от растеж“), който е валиден само когато се прилага кинетика от първи порядък. В случай че са налице признаци, че не се прилага кинетика от първи порядък, е препоръчително да се търси консултация от статистик в областта на биологията, за подходящо коригиране за понижаване на концентрацията в резултат от растеж, или да се използва описаният по-долу подход, основан на масата.

В някои случаи на този метод за коригиране за понижаване на концентрацията в резултат от растеж му липсва прецизност, а понякога той не работи (например за много бавно очистващи се вещества, изпитвани в бързорастящи риби, получената константата на скоростта на очистване, коригирана за понижаване на концентрацията в резултат от растеж, k_{2g} , може да е много малка и по този начин грешката в двете константи на скоростта, използвани, за да бъде получена, става критична, и в някои случаи оценките за k_g могат да бъдат по-големи от k_2). В такива случаи може да се използва алтернативен подход (т.е. подход, основан на масата), при който се избягва необходимостта от корекция и който работи и когато не се прилага кинетика от първи порядък. Този подход е описан в края на настоящия раздел.

Метод за коригиране на растежа с изваждане на константата на скоростта на растеж

При стандартния метод всички данни за отделни тегла и дължини се преобразуват в естествени логаритми и $\ln(\text{тегло})$ или $\ln(1/\text{дължина})$ се начертава спрямо времето (ден), поотделно за изпитваните и за контролните групи. Същият процес се извършва отделно за данните от фазите на поглъщане и на очистване. Обичайно за коригирането за понижаване на концентрацията в резултат от растеж е по-целесъобразно да се използват данни за теглото от цялостното проучване за определяне на

⁽¹⁾ Трябва да се има предвид, че неопределеността при оценката на k_2 не се използва правилно в модела за биоаккумуляция, когато тя се разглежда като константа при изглаждане на k_1 в метода с последователно изглаждане. Следователно произтичащата неопределеност на BCF ще се различава между едновременния метод и метода с последователно изглаждане.

▼ M7

константата на скоростта на растежа (k_g), но статистически значимите разлики между константите на скоростта на растежа, получени за фазата на поглъщане и за фазата на очистиране, може да са признак, че следва да бъде използвана константата на скоростта от фазата на очистирането. Общите скорости на растеж от изследвания по воден път за изпитваните и контролните групи могат да се използват за извършване на проверка за всякакви свързани с третирането ефекти.

Изчислява се корелация с линеен метод на най-малките квадрати за $\ln(\text{тегло на риба})$ спрямо ден (и за $\ln(1/\text{тегло})$ спрямо ден) за всяка група (изпитвана или изпитвани и контролна групи, индивидуални данни, не средни дневни стойности) за цялото изследване, за фазите на поглъщане и на очистиране, като се използват стандартни статистически процедури. Изчисляват се дисперсиите на наклоните на линиите и се използват за оценка на статистическата значимост ($p = 0,05$) на разликата между наклоните (константите на скоростите на растеж) с помощта на t -теста на Стюдънт (или с ANOVA, ако е изпитвана повече от една концентрация). Данните за теглото обикновено се предпочитат за целите на корекцията за растеж. Данните за дължината, обработени по същия начин, могат да са полезни при сравняване на контролните и изпитваните групи за свързани с третирането ефекти. Ако няма статистически значима разлика в анализа на данните за теглото, данните за изпитваните и контролните групи могат да бъдат обединени и да се изчисли обща константа на скоростта на растежа на рибите за изследването (k_g) като общ наклон на линейната корелация. Ако се наблюдават статистически значими разлики, константите на скоростта на растежа за всяка група риби и/или фаза от изследването се протоколират отделно. След това константата на скоростта от всяка третирана група следва да се използва за целите на коригирането за понижаване на концентрацията в резултат от растеж в тази група. Ако са отбелязани статистически разлики между константите на скоростта от фазата на поглъщане и от фазата на очистиране, следва да се използват константите на скоростта, получени за фазата на очистиране.

Изчислената константа на скоростта на растеж (k_g изразена като ден^{-1}) може да се извади от общата константа на скоростта на очистирането (k_2), за да се получи константата на скоростта на очистиране k_{2g} .

$$k_{2g} = k_2 - k_g \quad [\text{Уравнение A5.27}]$$

Константата на скоростта на поглъщане се разделя на коригираната за растеж константа на скоростта на очистиране за да се получи коригираният за растеж кинетичен BCF, обозначаващ като BCF_{K_g} (или BMF_{K_g}).

$$\text{BCF}_{K_g} = \frac{k_1}{k_{2g}} \quad [\text{Уравнение A5.29}]$$

Константата на скоростта на растеж, получена за изследване с експозиция чрез хранителния режим, се използва в уравнение A7.5 за изчисляване на коригирания за растеж BMF_{K_g} (вж. допълнение 7).

Метод за коригиране за растеж, основан на масата

Алтернатива на горния „Метод за коригиране на растежа с изваждане на константата на скоростта на растеж“, при която се избягва необходимостта от коригиране за растеж, може да се използва, както следва. Принципът е да се използват данни от очистирането въз основа на масата за цяла риба, а не въз основа на концентрацията.

Тъканните концентрации от фазата на очистирането (маса на изпитваното вещество/единица маса на риба) се преобразуват в маса на изпитваното вещество/риба: концентрациите и индивидуалните тегла на рибите се разполагат успоредно в таблична форма (например чрез използване на компютърна електронна таблица) и всяка концентрация се умножава по общото тегло на рибата за това измерване, за да се получи набор от маси на изпитваното вещество/риба за всички проби от фазата на очистиране.

Получените стойности на естествения логаритъм на данните за масата на веществото се начертават спрямо времето за опита (фаза на очистиране), както би било направено обичайно.

▼ M7

При метода с експозиция по воден път, константата на скоростта на поглъщане се получава по рутинния начин (вж. раздели 4 и 6, като следва да се отбележи, че в уравненията за апроксимация за k_1 следва да се използва „нормалната“ стойност на k_2), след което от горните данни се получава константата на скоростта на почистване. Тъй като получената стойност за константата на скоростта на почистване е независима от растежа поради това, че е получена на база маса на цяла риба, тя следва да бъде обозначена като k_{2g} , а не като k_2 .

8. НОРМАЛИЗАЦИЯ ЗА ЛИПИДИ КЪМ 5 % СЪДЪРЖАНИЕ НА ЛИПИДИ (САМО ЗА МЕТОДА С ЕКСПОЗИЦИЯ ПО ВОДЕН ПЪТ)

Резултатите за BCF (кинетичен и в стационарно състояние) от изпитванията с експозиция по воден път следва също да бъдат протоколирани по отношение на стойност на липидно съдържание на рибата по подразбиране 5 % мокро тегло, освен ако може да се аргументира, че изпитваното вещество не се натрупва основно в липиди (напр. някои напълно флуорирани вещества могат да се свързват с белтъци). Данните за концентрациите в риби или BCF трябва да бъдат преобразувани към основа 5 % съдържание на липиди мокро тегло. Ако дадена една и съща риба е използвана за измерване на концентрациите на веществото и на липидното съдържание във всички точки на пробовземане, това изисква всяка отделно измерена концентрация в рибата да бъде коригирана за липидното съдържание в дадената риба.

$$C_{f,L} = \frac{0,05}{L} \cdot C_f \quad \text{[Уравнение A5.30]}$$

където

$C_{f,L}$ = нормализирана за липиди концентрация в рибата (mg kg^{-1} мокро тегло)

L = липидна фракция (въз основа на мокро тегло)

C_f = концентрация на изпитваното вещество в рибата (mg kg^{-1} мокро тегло)

Ако анализът за липиди не е извършен за всички пробовзети риби, за нормализация на BCF се използва средна стойност на липидите. За BCF в стационарно състояние следва да се използва средната стойност, отчетена в края на фазата на поглъщане в третираната група. За нормализация на кинетичен BCF може да има случаи, когато е оправдан различен подход, например ако съдържанието на липиди се е променило подчертано по време на фазата на поглъщане или на почистване. Независимо от това, така или иначе следва рутинно да се използва скорост на хранене, която свежда до минимум драматичните промени в липидното съдържание.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \quad \text{[Уравнение A6.1]}$$

където

BCF_{KL} = кинетичен BCF с нормализация за липиди ($L \text{ kg}^{-1}$)

L_n = средна липидна фракция (въз основа на мокро тегло)

BCF_K = кинетичен BCF ($L \text{ kg}^{-1}$)

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343–2355.
- (2) Глава B.20 от настоящото приложение, Изпитване за размножаване на *Daphnia magna*.
- (3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 309-320.

▼ M7

- (4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.
- (6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.
- (7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- (9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. *T. Am. Fish. Soc.* 104: 785-792.
- (10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*, Sheeman, P., *et al.*, Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.
- (11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. *Can. J. Chem. Eng.* 55: 614-622.
- (12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
- (13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere.* 9: 3-19.

▼ **M7**

Допълнение 6

**УРАВНЕНИЯ ЗА ИЗПИТВАНЕТО С ЕКСПОЗИЦИЯ ПО ВОДЕН
ПЪТ: ПЛАН СЪС СВЕЖДАНЕ ДО МИНИМУМ НА
ЕКСПОЗИЦИЯТА**

Обяснението за този подход е, че коефициентът на биоконцентрация при цялостно изпитване може да бъде определен или като коефициент на биоконцентрация в стационарно състояние (BCF_{SS}) чрез изчисляване на отношението на концентрацията на изпитваното вещество в рибната тъкан към концентрацията на изпитваното вещество във водата, или чрез изчисляване на кинетичния коефициент на биоконцентрация (BCF_K) като отношение на константата на скоростта на поглъщането k_1 към константата на скоростта на очистиране k_2 . BCF_K е валиден дори ако концентрацията на дадено вещество в стационарно състояние не е постигната по време на поглъщането, при условие че поглъщането и очистирането следват приблизително процеси с кинетика от първи порядък.

Ако измерването на концентрацията на веществото в тъкани (C_f) се извършва в момента, в който експозицията приключва (t_1) и концентрацията в тъканите (C_{f2}) се измерва отново след изтичането на определен период от време (t_2), константата на скоростта на очистиране (k_2) се изчислява, като се използва уравнение A5.22 от допълнение 5.

След това константата на скоростта на поглъщане k_1 може да се определи по алгебричен път, като се използва уравнение A5.23 от допълнение 5 (където C_f е равно на C_{f1} и t е равно на t_1) (1). По този начин кинетичният коефициент на биоконцентрация за плана със свеждане до минимум на експозицията (определен като BCF_{Km} , за да се разграничава от кинетичните коефициенти на биоконцентрация, определени с помощта на други методи) е:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Уравнение A6.2}]$$

Концентрациите или резултатите следва да бъдат коригирани за понижаване на концентрацията в резултат от растеж и нормализирани към съдържание на липиди в рибите, равно на 5 %, както е описано в допълнение 5.

BCF_{SS} при свеждане до минимум на експозицията се изчислява в края на фазата на поглъщане, като се допуска, че е достигнато стационарно състояние. Това може само да бъде допуснато, тъй като броят на точките на пробовземане не е достатъчен за доказването му.

$$\text{минимизиран } BCF_{SS} = \frac{C_{f-\text{minSS}}}{C_{w-\text{minSS}}} \quad [\text{Уравнение A6.2}]$$

където

$C_{f-\text{minSS}}$ = Концентрация в риби при допускане за стационарно състояние в края на поглъщането ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ мокро тегло).

$C_{w-\text{minSS}}$ = Концентрация във вода при допускане за стационарно състояние в края на поглъщането ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$).

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.

▼ **M7**

Допълнение 7

УРАВНЕНИЯ ЗА ИЗПИТВАНЕТО С ЕКСПОЗИЦИЯ ЧРЕЗ ХРАНИТЕЛНИЯ РЕЖИМ:

1. Пример за количество на съставките в подходяща налична в търговската мрежа храна за риби
2. Примери за техники на добавяне на вещество в храната
3. Изчисляване на ефикасността на усвояването и на коефициента на биомултипликация
4. Корекция за липиди
5. Оценка на разликите между измерената концентрация във времева точка нула ($C_{0,m}$) и получената концентрация във времева точка нула ($C_{0,d}$)
6. Насоки за изпитвани вещества с много бързо почистване

1. ПРИМЕР ЗА КОЛИЧЕСТВО НА СЪСТАВКИТЕ В ПОДХОДЯЩА НАЛИЧНА В ТЪРГОВСКАТА МРЕЖА ХРАНА ЗА РИБИ

Основна съставка	рибно брашно
Суров белтък	$\leq 55,0 \%$
Сурови мазнини	$\leq 15,0 \%$ ⁽¹⁾
Сурови влакнини	$\geq 2,0 \%$
Влажност	$\geq 12 \%$
Пепелно съдържание	$\geq 8 \%$

⁽¹⁾ В някои региони може да е възможно да се получи само храна за риби с липидна концентрация, която е далеч по-ниска от тази горна граница. В такива случаи изследванията следва да се проведат с по-ниската липидна концентрация в храната, както е доставена, и скоростта на хранене да се коригира по подходящ начин за поддържане на здравето на рибите. Липидите от хранителния режим следва да не се увеличават по изкуствен начин чрез добавяне на прекомерно количество масло.

2. ПРИМЕРИ ЗА ТЕХНИКИ НА ДОБАВЯНЕ НА ВЕЩЕСТВО В ХРАНАТА**Общи положения**

Контролните хранителни режими следва да бъдат приготвяни по съвсем същия начин като хранителния режим с добавка, но в отсъствие на изпитваното вещество.

За проверка на концентрацията на третирания хранителен режим следва да бъдат извлечени с подходящ метод за извличане в три повторения проби от дозираната храна, и следва да бъде измерена концентрацията или радиоактивността на изпитваното вещество в извлеките. Следва да бъдат доказани високи аналитични добиви ($> 85 \%$) с малко вариране между пробите (три концентрации на веществото, измерени в проби, взети в началото на изпитването, не трябва да се отклоняват с повече от $\pm 15 \%$ от средната стойност).

По време на изпитването чрез хранителния режим, три проби от хранителния режим за анализ следва да бъдат събрани в ден 0 и в края на фазата на поглъщане за определяне на съдържанието на изпитваното вещество в хранителния режим.

Приготвяне на храна за риби с течен материал за изпитване (чист)

Целевата номинална изпитвана концентрация в третираната храна за риби се определя например на $500 \mu\text{g}$ изпитвано вещество/g храна. Подходящото количество (по моларна маса или специфична радиоактивност) чисто изпитвано вещество се добавя към известна маса храна за риби в стъклен буркан или колба за ротационен изпарител. Масата на храната за риби следва да бъде достатъчна за продължителността на фазата на поглъщане (като се вземе предвид необходимостта от увеличаване на количествата на всяко подаване на храна поради растежа

▼ **M7**

на рибите). Храната за риби/изпитваното вещество се смесват за една нощ бавно обръщане в барабан (например чрез използване на смесител „Roto-Rack“ или чрез въртене, ако се използва колбата за ротационен изпарител). Хранителният режим с добавка трябва да се съхранява при условия, които запазват стабилността на изпитваното вещество в рамките на фуражния микс (например с охлаждане) до използването.

Приготвяне на храна за риби с носител царевично или рибено масло

Твърдите изпитвани вещества следва да бъдат стрити в хаван до фин прах. Течните вещества за изпитването могат да се добавят директно в царевичното или рибеното масло. Изпитваното вещество се разтваря в определено количество царевично или рибно масло (напр. 5-15 ml). Дозираното масло се прехвърля количествено в колба за ротационен изпарител с подходящ размер. Флаконът, използван за приготвяне на дозираното масло, трябва да се изплакне с две малки аликвотни части от масло и те следва да се добавят към колбата, за да се гарантира, че е прехвърлено цялото количество разтворено изпитвано вещество. За да се осигури пълно разтваряне/диспергиране в маслото (или ако в изследването се използва повече от едно изпитвано вещество) се добавя микро-бъркалка, колбата се запущва и сместа се разбърква бързо през нощта. Подходящо количество хранителен режим за риби за изпитването (обикновено във форма на пелети) се добавя към колбата и съдържанието на колбата се хомогенизира чрез непрекъснато обръщане на колбата в продължение най-малко на 30 минути, но за предпочитане през нощта. След това храната с добавка се съхранява по подходящ начин (напр. с охлаждане), за да се гарантира стабилността на изпитваното вещество в храната, докато тя бъде използвана.

Приготвяне на храна за риби с органичен разтворител

Подходящо количество от изпитваното вещество (по моларна маса или специфична радиоактивност), достатъчно за достигането на прицелната доза, се разтваря в подходящ органичен разтворител (напр. циклохексан или ацетон; 10-40 ml, но при необходимост и в по-голям обем, в зависимост от количеството храна, към която трябва да се добави добавката). Аликвотна част или цялото количество (добавяно на порции) от този разтвор се смесва с подходяща маса храна за риби, достатъчна при изпитването да се достигне изискваното номинално ниво на доза. Храната/изпитвано вещество могат да бъдат смесени в смесителна купа от неръждаема стомана и прясно дозираната храна за риби може да се остави в купата в лабораторна камина в продължение на два дни (като се разбърква от време на време), за да се позволи на излишъка от разтворителя да се изпари, или се смесват чрез непрекъснатата ротация в колба за ротационен изпарител. При необходимост излишъкът от разтворител може да бъде „издухан“ със струя въздух или азот. Трябва да се вземат мерки, за да се гарантира, че изпитваното вещество не образува кристали при отстраняването на разтворителя. Хранителният режим с добавка трябва да се съхранява при условия, които запазват стабилността на изпитваното вещество в рамките на фуражния микс до използването (например с охлаждане).

3. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА ЕФИКАСНОСТТА НА УСВОЯВАНЕТО И НА КОЕФИЦИЕНТА НА БИОМУЛТИПЛИКАЦИЯ

За изчисляване на ефикасността на усвояването първо трябва да бъде оценена общата константа на скоростта на очистиането, в съответствие с раздел 4 от допълнение 5 (с използване на „последователния метод“, т.е. стандартна линейна регресия), като се използват средните концентрации на пробите от фазата на очистиането. Константата на скоростта на хранене, I , и продължителността на поглъщането, t , са известни параметри за изследването. Измерената средна концентрация на изпитваното вещество в храната, C_{food} , е измервана променлива при изпитването. Концентрацията на изпитваното вещество в рибата в края на фазата на поглъщане, $C_{0,d}$, обикновено се получава от пресечната точка на графиката $\ln(\text{концентрация})$ спрямо ден от очистиането.

Ефикасността на усвояването на веществото (α , абсорбция на изпитваното вещество в червата) се изчислява, както следва:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{\text{food}}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad [\text{Уравнение A7.1}]$$

където:

$C_{0,d}$ = получената концентрация в рибите във времева точка нула от фазата на очистиане (mg kg^{-1});

▼ M7

k_2 = обща (която не е коригирана за растеж) константа на скоростта на почистване (ден^{-1}), изчислена съгласно уравненията в допълнение 5, раздел 3;

I = константата на скоростта на поглъщане на храна (g храна g^{-1} риба ден^{-1});

C_{food} = концентрация в храната (mg kg^{-1} храна);

t = продължителност на периода на хранене (ден)

Независимо от това може да се наложи скоростта на хранене I , използвана в изчислението, да бъде коригирана за растеж на рибите, за да се даде точна ефикасност на усвояването α . При изпитванията със значим растеж на рибите по време на фазата на поглъщане (при които не се прави корекция на количествата фураж, за да се запази определената скорост на хранене), реалната скорост на хранене с течение на времето във фазата на поглъщане ще бъде по-ниска от определената, което ще води до по-висока „реална“ ефикасност на усвояването. (Следва да се отбележи, че това не е важно за общото изчисляване на ВМФ, тъй като членовете I в действителност се съкращават между уравнения А7.1 и А7.4). Средната скорост на хранене, коригирана за понижаване на концентрацията в резултат от растеж, I_g , може да бъде получена по няколко начина, но лесен и строг начин е да се използва известната константа на скоростта на растежа (k_g) с цел да се определят теглата на изпитваните риби в определени времеви точки от фазата на поглъщане, т.е.:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \quad [\text{Уравнение А7.2}]$$

където

$W_f(t)$ = средно тегло на рибата в деня t от фазата на поглъщане

$W_{f,0}$ = средно тегло на рибата в началото на опита

По този начин може да се оцени (поне) средното тегло в последния ден от експозицията ($W_{f,\text{end-of-uptake}}$). Тъй като скоростта на храненето е основана на $W_{f,0}$, действителната скорост на храненето за всеки ден от поглъщането може да бъде изчислена с помощта на тези две стойности за теглото. След това скоростта на хранене, коригирана за растеж, I_g , (g храна g^{-1} риба ден^{-1}), която да се използва вместо I в случаи на бърз растеж през фазата на поглъщане, може да бъде изчислена като

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,\text{end-of-uptake}}} \quad [\text{Уравнение А7.3}]$$

След получаването на ефикасността на усвояването може да се изчисли ВМФ, като се умножи тя по константата на скоростта на поглъщане I (или I_g , ако се използва за изчисляване на α) и произведението се раздели на общата константа на скоростта на почистването k_2 :

$$\text{BMF} = \frac{I \times \alpha}{k_2} \quad [\text{Уравнение А7.4}]$$

Коригираният за растеж коефициент на биомултипликация също следва да се изчислява по същия начин, с използване на коригираната за растеж константа на скоростта на почистване (получена съгласно раздел 7 от допълнение 5). Отново, ако за да се изчисли α е използван I_g , той следва да се използва също и тук вместо I :

$$\text{BMF} = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \quad [\text{Уравнение А7.5}]$$

където:

α = ефикасност на усвояването (абсорбция на изпитваното вещество в червата);

k_2 = обща (която не е коригирана за растеж) константа на скоростта на почистване (ден^{-1}), изчислена съгласно уравненията в допълнение 5, раздел 3;

▼ **M7**

k_{2g} = коригирана за растеж константа на скоростта на очистиране (ден⁻¹);

I = константа на скоростта на поглъщане на храна (g храна g⁻¹ риба ден⁻¹);

Коригираният за растеж период на полуразграждане ($t_{1/2}$) се изчислява, както следва.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{2g}} \quad [\text{Уравнение A7.6}]$$

Ефикасността на усвояване на веществото от хранителния режим също може да се оцени, ако са определени остатъци в тъканите по време на етапа с линейна зависимост от фазата на поглъщане (между дни 1 и 3). В този случай ефикасността на усвояване на веществото (α) може да се определи, както следва:

$$\alpha = \frac{C_{fish}(t)}{I \times C_{food} \times t} \quad [\text{Уравнение A7.7}]$$

където

$C_{fish}(t)$ = концентрация на изпитваното вещество в рибата във време t (mg kg⁻¹ мокро тегло).

4. КОРЕКЦИЯ ЗА ЛИПИДИ

Ако съдържанието на липиди е измерено в същите риби, които са използвани за химичен анализ, във всички интервали на пробовземане, индивидуалните концентрации следва да бъдат коригирани на база липиди и $\ln(\text{концентрация, коригирана за липиди})$, начертана спрямо (ден от) очистирането, за получаване на $C_{0,d}$ и k_2 . След това може да се изчисли ефикасността на усвояване (Уравнение A7.1) на база липиди, използвайки C_{food} на база липиди (т.е. C_{food} се умножава по средната липидна фракция в храната). Последващо изчисление с използване на уравнения A7.4 и A7.5 ще даде директно BMF, коригиран за липиди (и за понижаване на концентрацията в резултат от растеж).

В противен случай се получават средните липидни фракции (w/w) в рибата и в храната, както за третираната, така и за контролната група (за храната и за контролната група риби това обикновено е от данните, измерени в началото и края на експозицията; за третираната група риби това обикновено е от данните, измерени само в края на експозицията). В някои изследвания липидното съдържание в рибите може да нарасне подчертано; в тези случаи е по-подходящо да се използва средната липидна концентрация в изпитваните риби, изчислена от измерените стойности в края на експозицията и края на очистирането. Като цяло, за определянето и на двете липидни фракции следва да се използват само данните от третираната група.

Коефициентът на корекция за липиди (L_C) се изчислява, както следва:

$$L_C = \frac{L_{fish}}{L_{food}} \quad [\text{Уравнение A7.8}]$$

където L_{fish} и L_{food} са съответно средните липидни фракции в рибата и в храната.

Коефициентът на корекция за липиди се използва, за да се изчисли коригирания за липиди коефициент на биомултипликация (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \quad [\text{Уравнение A7.9}]$$

5. ОЦЕНКА НА РАЗЛИКИТЕ МЕЖДУ ИЗМЕРЕНАТА КОНЦЕНТРАЦИЯ ВЪВ ВРЕМЕВА ТОЧКА НУЛА ($C_{0,m}$) И ПОЛУЧЕНАТА КОНЦЕНТРАЦИЯ ВЪВ ВРЕМЕВА ТОЧКА НУЛА ($C_{0,d}$)

Измерената концентрация във времева точка нула ($C_{0,m}$) и получената концентрация във времева точка нула ($C_{0,d}$) следва да бъдат сравнени. Ако те са много сходни, тогава това подкрепя модела с кинетика от първи порядък, използван за получаване на параметрите за очистирането.

▼ M7

В някои изследвания може да има подчертана разлика между получената стойност във времева точка нула, $C_{0,d}$, и средната измерена концентрация във времева точка нула, $C_{0,m}$ (вж. последното тире от точка 159 от настоящия метод за изпитване). Ако $C_{0,d}$ е много по-ниска от $C_{0,m}$ ($C_{0,d} \ll C_{0,m}$), разликата може да предполага наличието на неразградена храна с добавка в червата. Това може да се провери опитно чрез провеждането на отделен анализ на изрязани черва, ако допълнителни проби (цели риби) са били пробовзети и съхранени в края на фазата на поглъщане. В противен случай, ако към линейната регресия за фазата на очистиането се приложи статистически валиден тест за стойности, силно различаващи се от нормалните, показващ че първата точка на пробовземане от очистиането е погрешно завишена, може да е подходящо извършване на линейна регресия за получаване на k_2 , но с пропускане на първата точка с концентрация от очистиането. В такива случаи, ако неопределеността от линейната регресия е значително намалена и е ясно, че се следва приблизително кинетика на очистиането от първи порядък, може да бъде уместно за изчисляването на ефикасността на усвояване да се използват получените стойности за $C_{0,d}$ и k_2 . Това следва да бъде цялостно обосновано в протокола. Възможно е също така при фазата на очистиането да е следвана кинетика, различна от кинетиката от първи порядък. Ако това е вероятно (т.е. ако изглежда, че \ln -трансформираните данни следват крива, в сравнение с графиката с правата линия от линейната регресия), тогава не е вероятно изчисленията за k_2 и $C_{0,d}$ да бъдат валидни и следва да се търси консултация от статистик в областта на биологията.

Ако $C_{0,d}$ е много по-висока от измерената стойност ($C_{0,d} \gg C_{0,m}$), това може да показва: че веществото е очистено много бързо (т.е. точките на пробовземане са достигнали границата на количествено определяне на метода за анализ на много ранен етап от фазата на очистиането, вж. раздел 6 по-долу); че е налице отклонение от кинетиката на очистиане от първи порядък; че линейната регресия за получаване на k_2 и $C_{0,d}$ е погрешна; или че в някои времеви точки на пробовземане е възникнал проблем с измерените концентрации в изследването. В такива случаи графиката с линейната регресия трябва да се проучи внимателно за доказателства за проби при границата на количествено определяне или близо до нея, за стойности, силно различаващи се от нормалните, или за очевидна кривина (сочеща кинетика, различна от кинетиката от първи порядък), и да бъде подчертана в протокола. Всяка последваща повторна оценка на линейната регресия за подобряване на стойностите от оценката трябва да бъде описана и обоснована. Ако се наблюдава очевидно отклонение от кинетиката от първи порядък, тогава не е вероятно изчисленията за k_2 и $C_{0,d}$ да са валидни и следва да се търси консултация от статистик в областта на биологията.

6. НАСОКИ ЗА ИЗПИТВАНИ ВЕЩЕСТВА С МНОГО БЪРЗО ОЧИСТВАНЕ

Както е посочено в точка 129 от метода на изпитване, някои вещества могат да се очистват толкова бързо, че да не могат да бъдат получени надеждни концентрации във времева точка нула, $C_{0,d}$ и k_2 , тъй като в пробите веществото в действителност вече не се измерва на много ранен етап (т.е. от втората проба от очистиането нататък) от фазата на очистиането (концентрации, отчетени на границата на количественото определяне). Тази ситуация е наблюдавана по време на кръговото изпитване, проведено в подкрепа на настоящия метод за изпитване с бензо[а]пирен, и е документирана в протокола за валидиране на метода. В такива случаи линейната регресия не може да се извърши надеждно, и е вероятно тя да даде нереално висока оценка на $C_{0,d}$, което води до привидна ефикасност на усвояване, много по-голяма от 1. В тези случаи е възможно да се изчисли консервативна оценка на k_2 и „горна граница“ на ВМФ.

Когато се използват онези точки с данни от фазата на очистиане, в които е измерена концентрация, включително до първата концентрация „без откриване“ (концентрация, определена на границата на количествено определяне), линейната регресия (като се използват \ln -трансформирани данни за концентрацията като функция от времето) ще даде оценка на k_2 . За тези видове случаи вероятно това ще включва само две точки с данни (напр. пробовземане в дни 1 и 2 от очистиането) и тогава оценка на k_2 може да се направи с помощта на уравнение A5.22 в допълнение 5. Тази оценка на k_2 може да се използва, за да се оцени ефикасността на усвояването съгласно уравнение A7.1, като стойността

▼ M7

на $C_{0,d}$ в уравнението се замени с измерената концентрация във времева точка нула ($C_{0,m}$) в случаите, когато $C_{0,d}$ е ясно оценена като много по-висока, отколкото би могло да се постигне при изпитването. Ако $C_{0,m}$ не е била измерима, тогава трябва да бъде използвана границата на откриване в рибните тъкани. Ако в някои случаи това дава стойност на $\alpha > 1$, тогава се допуска, че ефикасността на усвояване е 1 като „най-лошият случай“.

Тогава максималният VMF_K може да се оцени, като се използва уравнение A7.4, и следва да се цитира като стойност „много по-малка от“ (\ll). Така например, при изследване, проведено със скорост на хранене 3 %, период на полуразграждане при очистването, по-кратък от 3 дни, и „най-лош случай“, при който α е 1, VMF_K вероятно ще е под приблизително 0,13. Предвид целта на тази оценка и с оглед на факта, че по своя характер стойностите ще са консервативни, не е необходимо коригирането им за понижаване на концентрацията в резултат от растеж или за съдържание на липиди в храната или в рибите.



Допълнение 8

ПОДХОДИ ЗА ОЦЕНКА НА ПРОБНИ BCF ОТ ДАННИТЕ, СЪБРАНИ ОТ ИЗСЛЕДВАНЕТО С ЕКСПОЗИЦИЯ ЧРЕЗ ХРАНИТЕЛНИЯ РЕЖИМ

Методът чрез хранителния режим е включен в настоящия метод за изпитване с оглед изпитване за биоаккумуляцията на веществата, които на практика не могат да бъдат изпитвани чрез използването на експозиция по воден път. Методът чрез експозиция по воден път дава коефициент на биоконцентрация, докато методът чрез хранителния режим води пряко до информация за потенциала за биомултипликация на храната. В много режими за безопасност на химичните вещества се изисква информация относно биоконцентрацията по воден път (например при оценката на риска и Глобалната хармонизирана система за класифициране). Следователно съществува необходимост от използване на данните, получени от изследването с експозиция чрез хранителния режим, за оценка на даден коефициент на биоконцентрация, който е сравним с изпитванията, които се провеждат съгласно метода с експозиция по воден път⁽¹⁾. Този раздел разглежда подходи, които могат да бъдат следвани, за да се направи това, като същевременно се отчитат недостатъците, които са присъщи на оценките.

Изследването чрез хранителния режим измерва очистиране за получаване на константата на скоростта на очистиране k_2 . Ако константата на скоростта на поглъщане може да се изчисли с наличните данни за случаи, когато рибите са били експонирани на изпитваното вещество чрез водата, тогава може да се направи оценка за кинетичния BCF.

Оценката за константата на скоростта на поглъщане при експозиция на изпитваното вещество по воден път се основава на множество допускания, като всички те допринасят за неопределеността на оценката. Освен това при този подход за оценка на BCF се допуска, че общата скорост на очистирането (включително допринасящи фактори като разпределението в тялото и индивидуалните процеси на очистиране) е независима от техниката за експозиция, предизвикваща поглъщането на изпитваното вещество в организма.

Основните допускания, присъщи на подхода за оценяването, могат да бъдат обобщени както следва.

Очистирането след поглъщането чрез хранителен режим е същото като очистирането след експозиция по воден път за дадено вещество

Поглъщането по воден път следва кинетика от първи порядък

В зависимост от използвания метод за оценка на поглъщането:

- поглъщането може бъде корелирано единствено с теглото на рибата
- поглъщането може бъде корелирано само с коефициента на разпределение октанол-вода на веществото
- поглъщането може бъде корелирано с комбинация от теглото на рибата и коефициента на разпределение октанол-вода на веществото
- фактори, които могат да въздействат на поглъщането при изследването с експозиция по воден път на практика, като бионаличност на веществото, адсорбция върху апаратурата, размер на молекулите и т.н., имат слаб ефект
- и, което е от изключително значение:

Базата данни („наборът за обучение“), използвана за разработването на метода за оценка, е представителна за разглежданото вещество

В няколко публикации в общодостъпни източници са изведени уравнения, свързващи поглъщането по воден път в риби чрез хрилете с коефициента на разпределение октанол-вода на дадено вещество, теглото на рибата (1) (2) (3) (4), обема и/или съдържанието на липиди, мембранната пропускливост/дифузията (5) (6), обема на вентилация на рибите (7) и с подход нетрайност/масовия баланс (8) (9) (10). Подробна оценка на такива методи в този контекст

⁽¹⁾ В природата пътят, водещ до най-голяма експозиция във водна среда за силно хидрофобни вещества вероятно ще бъде чрез поглъщане и по този начин оценката за BCF не е строго представителна за потенциала за биоаккумуляция на такова вещество.

▼ M7

е дадена в Crookes & Brooke (11). Една публикация на Barber (12), съсредоточена върху моделирането на биоаккумуляцията чрез поглъщането чрез хранителен режим, също е полезна в този контекст, тъй като тя включва приноси от модели за скоростта на поглъщане чрез хрилете. Част от основния документ към протокола от 2004 чрез хранителния режим (13) също е посветена на този аспект.

Повечето от тези модели изглежда са получени с помощта на ограничени бази данни. За модели, при които са налични подробности за базата данни, използвана при разработването на модела, изглежда, че използваните типове вещества често са със сходна структура или са от сходен клас (по отношение на функционалността, напр. органохлорни съединения). Това увеличава неопределеността при използването на модел за прогнозиране на константата на скоростта на поглъщане за различен тип вещество, в допълнение към специфичните за изпитването съображения, като животински вид, температура и т.н.

В преглед на наличните техники (11) се подчертава, че нито един метод не е „по-правилен“ от останалите. Поради това следва да се даде ясна обосновка за използвания модел. Когато съществуват няколко метода, чието използване може да бъде обосновано, може да е разумно да се представят няколко оценки на k_1 (и следователно BCF) или обхват от стойности на k_1 (и BCF) според няколко метода за оценка на поглъщането. Независимо от това, предвид различията в отделните видове модели и набори от данни, използвани за тяхното разработване, вземането на средна стойност от оценките, получени по различни начини, не би било подходящо.

Някои изследователи са приели като изходно положение, че оценки на BCF от този тип изискват корекция по отношение на бионаличността за отчитане на адсорбцията на веществото върху разтворения органичен въглерод (DOC) в условия на експозиция по воден път, за привеждане на оценката в съответствие с резултатите от изследвания с експозиция по воден път (напр. (13) (14)). Независимо от това тази корекция може да не е подходяща, предвид ниските равнища на DOC, изисквани за изследванията с експозиция по воден път за оценка „в най-лошия случай“ (т.е. отношение на бионаличното вещество към веществото, измерено в разтвор). За силно хидрофобни вещества поглъщането чрез хрилете може да се ограничи от скоростта на пасивната дифузия в близост до повърхността на хрилете; в този случай е възможно корекцията да отчита този ефект, а не онова, за което е предназначена;

За предпочитане е съсредоточаване върху методи, които се нуждаят от входни параметри, за които данните ще бъдат лесно достъпни за веществата, изпитани съгласно изследването чрез хранителния режим, описано тук (напр. $\log K_{OW}$, тегло на рибите). Други методи, които изискват по-сложни входни параметри, могат да се прилагат, но може да изискват извършването на допълнителни измервания в изследването, или подробни познания за изпитваното вещество или вида риби, които може да не са широко достъпни. В допълнение, изборът на модел може да бъде повлиян от степента на валидиране и областта на приложимост (виж (11) за преглед и сравнение на различни методи).

Следва да се има предвид, че резултантната оценка за k_1 и оценката за BCF са неопределени и може да се наложи да бъдат обработени в рамките на подход, основан на тежестта на доказателствата, заедно с получения BMF и параметрите на веществото (например размер на молекулата) за цялостна картина за потенциала за биоаккумуляция на веществото. Тълкуването и използването на тези параметри може да зависи от регулаторната рамка.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 25: 1-14.
- (2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. *Aquat. Toxicol.* 30: 325-341.
- (3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.

▼ M7

- (4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 1963-1992.
- (5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in *Aquatic Toxicology and Environmental Fate*, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.
- (6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343-2355.
- (7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
- (8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1399-1420.
- (9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. *Environ. Sci. Technol.* 31: 577-583.
- (10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. *QSAR Comb. Sci.* 22: 337-345.
- (11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.
- (12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 755-777
- (13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in *Handbook of property estimation methods for chemicals*, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA: 189-231.

▼B

B.14. ТЕСТВАНЕ РАСТЕЖА НА МЛАДИТЕ РИБИ

1. МЕТОД

Този метод за изследване на токсичността при растежа е точно копие на OECD TG 215 (2000).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Това тестване се планира с цел да се направи оценка на въздействието при продължително излагане на химикали при растежа на младите риби. Базира се на метода, развит и кръгово тестван (1) (2) в Европейския съюз, за оценка на въздействията от химикали върху растежа на младата дъгова пъстърва (*Oncorhynchus mykiss*) в потокови условия. Могат да се използват и други добре документирани видове. Например е постигнат опит от тестове върху растежа с риба зебра (*Danio rerio*)⁽¹⁾ (3) (4) и оризова риба (медака, *Oryzias latipes*) (5) (6) (7).

Вижте също Основно въведение, част В.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Най-ниска концентрация на наблюдавано въздействие (LOEC): е най-ниската тествана концентрация от тестваното вещество, при която се наблюдава значително въздействие на веществото (при $p < 0,05$), при сравнение с контрола. Обаче всички тествани концентрации над LOEC трябва да имат вредно въздействие, равно или по-голямо от това, наблюдавано при LOEC.

Концентрация на ненаблюдавано въздействие (NOEC): това е тестваната концентрация непосредствено под концентрацията LOEC.

ЕС_x: в този метод на извършване на теста представлява концентрацията тествано вещество, която причинява x % променливост при величината на растеж на рибите в сравнение с контролите.

Скорост на концентрация: е мокрото тегло на рибата на количество вода.

Плътност на биомасата: е броят на рибата на количество вода.

Индивидуална скорост на специфичния растеж на рибата: изразява скоростта на растежа на един индивид, основана на първоначалното тегло.

Основна за резервоара специфична скорост на растеж: изразява основната скорост на растеж за резервоара при една концентрация.

Псевдоспецифична скорост на растеж: изразява индивидуалната скорост на растежа в сравнение с основното първоначално тегло на резервоара.

⁽¹⁾ Meyer, A., Bierman, C. H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio Rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231—236.

▼B

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ТЕСТВАНЕ

След измерване на теглото, младата риба при фаза на експоненциален растеж се поставя в помещенията за тестване и се излага на серия сублетални концентрации от тестваното вещество, разтворено за предпочитане във вода при течение, или ако не е възможно при подходящи полустатични (статично-сменяеми) условия. Продължителността на теста е 28 дни. Рибите се хранят всекидневно. Съотношението на храната се основава на първоначалното тегло на рибата и може да се преизчисли след 14 дни. На края на теста теглото на рибата се измерва отново. Въздействието върху скоростта на растежа се анализира като се използват регресивни модели с цел да се изчисли концентрацията, която би довела до x % променливост в скоростта на растежа, т.е. EC_x (например EC_{10} , EC_{20} или EC_{30}). Като алтернатива данните могат да се сравняват с контролните стойности с цел да се определи най-ниската концентрация на наблюдавано въздействие (LOEC) и следователно концентрацията на ненаблюдавано въздействие (NOEC).

1.4. ИНФОРМАЦИЯ ЗА ТЕСТВАНОВОТО ВЕЩЕСТВО

Резултатите от теста за остра токсичност (виж метода на тест В.1), за предпочитане извършен с избрани за този тест видове, следва да са на разположение. Това предполага, че водната разтворимост и парното налягане на тестваното вещество са известни и е налице надежден аналитичен метод за количествено определяне на веществото в тествания разтвор с позната и отчетена точност и е налице ограничаване на откриването.

Полезната информация включва формула на структурата, чистота на веществото, устойчивост на вода и светлина, pK_a , P_{ow} и резултати от изследване на готово биохимично разлагане (вж. метод на теста В.4).

1.5. ВАЛИДНОСТ НА ТЕСТА

За да е валиден тестът, се прилагат следните условия:

- в края на теста контролираната смъртност не трябва да превишава 10 %,
- основното контролирано тегло на рибата трябва да се повишава, така че да позволява установяване на минималната променливост на скоростта на растеж, отбелязана като значителна. Кръгов тест (3) е показал, че за дъговата пъстърва основното тегло на контролираната риба се е повишило с поне половината (т.е. 50 %) от тяхното средно първоначално тегло за 28 дни; например първоначално тегло: 1g/риба (= 100 %), крайно тегло след 28 дни: = 1,5 g/риба (= 150 %),
- концентрацията на разтворен кислород трябва да бъде поне 60 % от стойността на насищане на въздуха с влага по време на теста,
- температурата на водата трябва да не по-висока от $\pm 1^\circ\text{C}$ между помещенията, в които се провежда теста, по всяко едно време по време на провеждането на теста, и се поддържа стойност от 2°C със специфичните за тестваните видове стойности на температурата (приложение 1).

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ТЕСТВАНЕ

1.6.1. Апаратура

Обикновено лабораторно оборудване, и по-специално следното:

- O_2 и pH-метър;

▼ B

- оборудване за определяне твърдост и алкалност на водата;
- подходяща апаратура за контрол на температурата и за предпочитане продължителен мониторинг;
- аквариуми, направени от химични инертни материали и с подходящ капацитет по отношение на препоръчителната плътност на зареждане и биомаса (вж. точка 1.8.5 и приложение I);
- подходящ прецизен баланс (т.е. прецизност от $\pm 0,5$ %).

1.6.2. Вода

Всяка вода, в която тестваният вид показва съответните признаци за дългосрочен живот и растеж, може да се използва като вода за тестване. Тя следва да е с постоянно качество през целия период на провеждане на теста. Стойността на рН на водата е от 6,5 до 8,5, но по време на тестване е $\pm 0,5$ рН единици. Препоръчва се твърдост над 140 mg/l (като CaCO₃). С цел да се гарантира, че разредената вода не влияе прекалено на резултатите от теста (например чрез образуване на координационно съединение на тестваното вещество), следва да се взимат проби за анализ на равни интервали от време. Правят се измервания на твърди метали (например Cu, Pb, Zn, Hg, Cd и Ni), основните аниони и катиони (например Ca, Mg, Na, K, Cl и SO₄), пестициди (например органофосфорни и органохлоридни пестициди), органичен въглерод и твърди частици, например на всеки три месеца, когато се знае, че водата за разреждане има съответното постоянно качество. Ако се вижда, че качеството на водата е постоянно за поне повече от една година, то изследванията могат да са по-редки и да се увеличат интервалите (например на всеки шест месеца). Някои от химичните характеристики на разредената вода за разреждане са изброени в допълнение 2.

1.6.3. Разтвори за извършване на изследването

Разтвори за теста при избрана концентрация се приготвят чрез разреждане на основния разтвор.

Основният разтвор се приготвя за предпочитане чрез просто смесване и разбъркване на тестваното вещество в разредена вода, като се използват механични средства (например разклащане или с помощта на ултразвук). За постигане на подходящо концентриран основен разтвор могат да се използват колони на насищане (колони на разтваряне).

Използването на разтворители и диспергиращи устройства (разтварящи фактори) може да се наложи в някои случаи с цел да се получи подходящ концентриран основен разтвор. Подходящи разтворители са например ацетонът, етанолът, метанолът, диметилсулфооксидът, диметилформамидът и триетиленгликолят. Примери за подходящи диспергиращи устройства са Smetophor RH 40, Tween 80, Метилцелулоза 0,01 % и HCO-40. При употребата на готови биоразграждащи вещества (например ацетон) и/или високолетливи съединения се взема предвид, че те могат да причинят проблеми с бактериалното натрупване при поточните тестове. Когато се използва разтворима добавка, тя не трябва да оказва нито значително въздействие върху растежа на рибите, нито невидими вредни ефекти върху младия екземпляр, проявени при контрол само чрез разтвора.

▼ B

За потоковите тестове се изисква система, която постоянно дозира и разрежда основния разтвор на тестваното вещество (например измерваща помпа, пропорционален разреждател, напоителни системи) за да се прехвърлят серии от концентрации към помещенията за тестване. Параметрите на изтичането на основния разтвор и водата за разреждане се проверяват на интервали, за предпочитане всеки ден, по време на извършването на теста и през това време не следва да се променят с повече от 10 %. Кръговите тестове (3) показват, че при дълговата пъстърва честотата на отстраняване на водата по време на теста от 6 l/g на риба/ден е приемлива.

За полустатичните (подновяемите) тестове честотата на средното подновяване ще зависи от устойчивостта на тестваното вещество, но се препоръчва всекидневна смяна на водата. Ако от първоначалните тестове за устойчивост (вж. точка 1.4), се вижда, че концентрацията на тестваното вещество не е стабилна (т.е. извън номиналните стойности от 80—120 % или падне под 80 % от измерената първоначална концентрация) по време на периода на смяна, се взема предвид употребата на потокови тестове.

1.6.4. **Избор на видове**

Дълговата пъстърва (*Oncorhynchus mykiss*) е видът, който се препоръчва за тези тестове, тъй като най-много опити са били сполучливи с този вид (1) (2). Обаче други добре документирани видове могат да се използват, но процедурата, по която се извършва тестът, може да се адаптира, за да се постигнат подходящи условия за провеждане на теста. Например има наличен опит с риба зебра (*Danio rerio*) (3) (4) и оризова риба (медака, *Oryzias latipes*) (5) (6) (7). В тези случаи се посочват причините за рационалното избиране на видовете и методът, по който ще се проведе експериментът.

1.6.5. **Отглеждане на рибата**

Рибата, която се използва за извършването на теста, се избира от популация на едно стадо, за предпочитане от едно и също изхвърляне на хайвера, който е бил отглеждан в продължение на поне две седмици преди теста, при условия, подобни на тези, използвани при теста, като качеството на водата и осветление. Те се хранят с минимум количество от 2 % от телесното тегло на ден и за предпочитане 4 % от телесното тегло на ден през време на периода на отглеждане и по време на теста.

В следващият 48-часов период се записват всички случаи на смъртност и се прилагат следните критерии:

- при смъртност, по-висока от 10 % от популацията за седем дни, се изхвърля цялата партида,
- при смъртност между 5 % и 10 % от популацията се изчаква аклиматизация за нови седем дни; ако смъртността е повече от 5 % през вторите седем дни, се изхвърля цялата партида,
- при смъртност, по-малко от 5 % от популацията за седем дни, партидата се приема.

При заболяване на рибите през последните две седмици, предхождащи теста, или по време на теста те не се третира с лекарства.

▼B

1.7. ПЛАНИРАНЕ НА ИЗВЪРШВАНЕТО НА ТЕСТА

Планирането на теста се изразява в избор на броя и разстоянието на тестваната концентрация, броя на аквариумите за всяко ниво концентрация и броя на рибите в аквариум. В идеални условия планирането на теста се извършва по отношение на:

- целите на проучването;
- метода на статистическия анализ, които ще се използва;
- наличност и цена на източниците на експеримента.

При излагането на целите, ако е възможно, се определят статистическите показатели, при които се изисква да се определи определен вид разлика (например при размера на растежа) или алтернативно се изисква точността, с която да се оцени EC_x (например с $x = 10, 20$ или 30 , и за предпочитане не по-малко от 10). Без да бъде извършено това, не може да се даде установено предписание за обхвата на изследването.

Важно е да се отбележи, че планирането, което е оптимално (с най-добра употреба на ресурсите) чрез използване на един метод на статистически анализ, не е непременно оптимално чрез използване на друг. Препоръчаното планиране за оценка на LOEC/NOEC следователно няма да бъде същото като това, което е препоръчано за регресионен анализ.

В повечето случаи регресионният анализ се предпочита пред дисперсионния анализ поради причини, дискутирани от Стефан и Роджърс (9). Обаче, когато не се намери подходящ регресионен модел ($\gamma_2 < 0,9$), следва да се използва LOEC/NOEC.

1.7.1. Проектиране на регресионния анализ

При проектирането на теста, който трябва да се анализира чрез регресия, е важно да се има предвид:

- концентрацията на въздействие (например $EC_{10, 20, 30}$) и стойността на концентрация, над която въздействието на тестваното вещество е от значение, е необходимо да се измерват чрез концентрацията, включена в теста. Точността, с която може да се направи оценка на концентрацията на въздействието, ще бъде най-голяма, когато концентрацията на въздействието е в средата на стойността на тестваната концентрация. Предварителни тестове за определяне на обхвата могат да бъдат полезни за правилното избиране на тестваната концентрация;
- за да е възможно задоволително статистическо моделиране, тестът следва да включва поне един контролен аквариум и пет допълнителни с различни концентрации. Когато е приложимо и когато се използва разтворимо вещество, се извършва контрол с разтворимото вещество на най-високата тествана концентрация като допълнение на тестовите серии (вж. точки 1.8.3 и 1.8.4);
- използват се подходящи геометрични и логаритмични серии (9) (вж. приложение 3). Трябва да се предпочете логаритмичното разпределяне на тестваната концентрация;

▼B

— ако повече от шест аквариума са на разположение, допълнителните аквариуми следва или да се използват за дубликати, или да се разпределят сред обхвата на концентрацията, за да се позволи по-близко разполагане на нивата. Всяка една от тези мерки е желателна в еднаква степен.

1.7.2. **Проектиране оценката на LOEC/NOEC чрез използване на дисперсионния анализ (ANOVA)**

За всяка концентрация се препоръчва дублиране на аквариума и статистическият анализ следва да се извършва на ниво аквариум (10). Без дублиращи аквариуми не може да се позволи разлика между аквариумите, извън тази, която се дължи на отделните риби. Обаче опитът показва, че в този случай (11) променливостта между аквариумите може в много малка степен да се сравнява с тази в аквариума (т.е. между рибите). Следователно сравнително приемлива алтернатива е да се извърши статистически анализ на ниво отделна риба.

Условно се използват поне пет концентрации в геометрична прогресия за предпочитане с коефициент, който не надвишава 3,2.

Обикновено, когато се извършват тестове с дублиращи аквариуми, броят на дублиращия контрол и следователно броят на рибите следва да е два пъти повече от броя в тестваните концентрации, които следва да са с еднакъв размер (12), (13), (14). Обратно, при липсата на дублиращ аквариум броят на рибите в контролната група е същият като броя във всяка тествана концентрация.

Ако ANOVA се основава по скоро на аквариума, отколкото на отделната риба (която би имала за последица индивидуално маркиране на рибата или употребата на „псевдо“ специфична скорост на растежа (вж. точка 2.1.2), има нужда от достатъчно дублиране на аквариумите, за да се даде възможност да се определи стандартното отклонение в „концентрацията на аквариума“. Това означава, че степента за свободна грешка при анализа на променливостта е поне 5 (10). Ако само контролните аквариуми се дублират, има опасност сгрешената променливост да бъде повлияна, защото може да се увеличи със средната стойност за съответната скорост на растеж. Тъй като е много вероятно скоростта на растежа да се намали с увеличаването на концентрацията, това ще доведе до надценяване на променливостта.

1.8. ПРОЦЕДУРА

1.8.1. **Избор и измерване теглото на тестваните риби**

Важно е променливостта в теглото на рибата в началото на теста да се сведе до минимум. Подходящият размер за различните видове, който се препоръчва при използване в теста, е даден в приложение 1. За цялата партида от риби, използвани в теста, стойностите на индивидуалните тегла в началото на теста теоретически се запазват в $\pm 10\%$ от средното аритметическо тегло и при всички случаи не надвишава 25%. Препоръчва се да се измерва и теглото на подобреца риба преди теста с цел да се изчисли средното тегло.

▼ **B**

24 часа преди началото на теста не се дава храна на основната популация. Рибите след това се избират произволно. Като се използва основно упойващо средство (например воден разтвор от 100 mg/l трикаин метан сулфонат (MS 222), неутрализиран допълнително от две части сода бикарбонат за една част MS 222), рибата следва да се измерва индивидуално като мокрото тегло (изсушаване до сухо) с точността, посочена в приложение 1. Тези риби с тегло в рамките на очакваното се съхраняват и след това се разпределят произволно между съдовете за теста. Общото мокро тегло на рибата във всеки съд се записва. Използването на упойващо средство, също както и отглеждането на рибите (включително изсушаването и измерването) може да причини стрес и наранявания на младата риба, и по-специално за видовете с малки размери. Следователно отглеждането на млади риби трябва да се извършва с най-голяма грижа, за да се избегне подлагането на стрес и нараняването на тестваните животни.

Теглото на рибите се измерва отново на двадесет и осмия ден от теста (вж. точка 1.8.6). Обаче, ако се намери за необходимо да се преизчисли порцията храна, теглото на рибата може да се измери отново на четиринадесетия ден от теста (вж. точка 1.8.2.3). Друг метод, като фотографския, може да се използва за определяне измененията при размера на рибата на основата, на която се определя порцията храна.

1.8.2. **Условия на излагане**1.8.2.1. *Продължителност*

Продължителността на теста е ≥ 28 дни.

1.8.2.2. *Скорост на зареждане и плътност на биомасата*

Важно е скоростта на концентрация и плътността на биомасата да са подходящи за използваните за теста видове (вж. приложение I). Ако плътността на биомасата е прекалено висока, в резултат от препълването ще се появи стрес, което ще доведе до намаляване скоростта на растежа, а е възможно да доведе и до заболяване. Ако е прекалено ниска може да се предизвика намаляване на териториалното поведение, което също ще рефлектира върху растежа. Във всички случаи, скоростта на концентрация следва да е достатъчно ниска, за да може да се поддържа концентрация на разтворен кислород от поне 60 % ASV без вентилиране. Кръговите тестове (2) показват, че за дъговата пъстърва, се приема скорост на концентрация от 16 пъстърви от 3—5 g в 40-литров обем. Препоръчителната честота на смяна на водата по време на теста е 6 l/g за риба/ден.

1.8.2.3. *Хранене*

Рибите следва да бъдат хранени с подходяща храна (приложение 1) в достатъчно количество за да се предизвика приемлива скорост на растежа. Следва да се полагат грижи за избягване появата на микроби и мътност на водата. За дъговата пъстърва стойност от 4 % от теглото ѝ на ден вероятно отговаря на тези условия (3), (15), (16), (17). Дневната порция може да бъде разделена на две равни части и да се дава на рибите на два пъти на ден, в период от поне пет часа. Порцията се основава на първоначалното общо тегло на рибата за всеки съд. Ако теглото на рибата се измери на четиринадесетия ден, порцията се преизчислява. Даването на храна се прекратява 24 часа преди измерването на теглото на рибата.

▼B

Неизядената храна и фекалните отпадъци следва да се изхвърлят от съда за тестване всеки ден чрез внимателно почистване на дъното на всеки аквариум, с използване на вакуум.

1.8.2.4. Светлина и температура

Продължителността на излагане на светлина и водната температура следва да са подходящи за тестваните видове (приложение I).

1.8.3. Тествана концентрация

Обикновено се изискват пет концентрации на тестваното вещество, без оглед на планирането на теста (вж. точка 1.7.2). Предишните познания за токсичността на тестваното вещество (например от акутен тест и/или сведения от проучвания за обхвата) помагат при избора на подходящ тест за концентрацията. Обосновава се използването на по-малко от пет концентрации. Най-високата тествана концентрация не следва да надвишава границата на разтворимост на веществото във вода.

Когато разтворимият фактор се използва, за да участва при подготовката на основния разтвор, неговата последна концентрация не следва да е по-висока от 0,1 ml/l и е за предпочитане да бъде еднаква при всички съдове за тестване (вж. точка 1.6.3). Независимо от това, всички усилия следва да са насочени към избягване употребата на подобни материали.

1.8.4. Контроли

Броят на контролите за разреждане във вода зависи от планирането на теста (вж. точки 1.7-1.7.2). Ако се използва разтворим фактор, тогава се включват същия брой контроли, както при контроли за разреждане във вода.

1.8.5. Честота на аналитичните установявания и измервания

По време на теста концентрациите на тестваното вещество се определят на равни интервали от време (вж. по-долу).

При потокови тестове, величината на течението на разтворителя и основния токсичен разтвор се проверяват на интервали, за предпочитане всеки ден, и следва да не варират с повече от 10 % по време на теста. Когато се очаква концентрациите тествано вещество да бъдат в ± 20 % от номиналната стойност (т.е. в стойности 80—120 %; вж. точки 1.6.2 и 1.6.3), се препоръчва като минимум да се анализират най-високата и най-ниската концентрация на теста при започването на теста и след това на интервали всяка седмица. За тестове, където концентрацията на тестваното вещество не се очаква да остане в номиналната стойност от ± 20 % (на основата на данни за стабилността на тестваното вещество), е необходимо да се анализират всички тествани концентрации, но като се следва същия режим.

При полустатичните (обновяеми) тестове, където концентрацията на тестваното вещество се очаква да остане в номиналната стойност от ± 20 %, се препоръчва като минимум да се анализират най-високата и най-ниската концентрация на теста, скоро след подготовката им и веднага преди възстановяването им в началото на проучването и след това всяка седмица. За тестове, където концентрацията на тестваното вещество не се очаква да остане в номиналната стойност от ± 20 %, трябва да се анализират всички тествани концентрации, следвайки същия режим като при повечето стабилни вещества.

▼ B

Препоръчва се резултатите да се базират на измерените концентрации. Обаче ако съществува доказателство, което показва, че концентрацията на тестваното вещество при разтваряне е поддържана на задоволително ниво в номиналната стойност от $\pm 20\%$ или по време на теста е измервана първоначалната концентрация, тогава резултатите могат да се основават на номиналната и на измерената стойности.

Възможно е да се наложи филтриране (т.е. използване на отвори с размер 0,45 (μm) или центрофугиране. Центрофугирането се препоръчва като процедура. Обаче в случай че тестваният материал не се адсорбира чрез филтрите, филтрирането също е приемливо.

По време на теста, разтворения кислород, рН и температурата от всеки съд за тестване следва да бъдат измервани. Общата твърдост, алкалност и соленост (ако се взема предвид) се измерват при контролните органи и съда с най-висока концентрация. Разтвореният кислород и солеността (ако се взема предвид) се измерват най-малко три пъти (в началото, средата и края на теста). При полустатичните тестове се препоръчва разтвореният кислород да се измерва по-често, за предпочитане преди и след всяка смяна на водата или поне веднъж на седмица. РН се измерва в началото и след всяка смяна на водата при статичните възстановими тестове и поне веднъж в седмицата при потоквите тестове. Твърдостта и алкалността се измерват поне веднъж по време на теста. За предпочитане е температурата да се наблюдава продължително по време на теста поне при един от съдовете.

1.8.6. Наблюдения

Тегло: в края на изследването трябва да се измери теглото на всички останали живи риби като мокро тегло (чрез пълно изсушаване) или в група от тествания съд, или поотделно. Измерването на теглото на животните от съда, използван при теста, се предпочита пред измерването на индивидуалното тегло, което изисква рибите да бъдат маркирани поотделно. При индивидуалното измерване за определяне на индивидуалната скорост на растеж на рибите, техниката за маркиране следва да бъде подбрана така, че да се избегне подлагането на стрес на животните (може да е подходящо използването на алтернативен на студентното маркиране метод, т.е. използването на тънка цветна линия).

Рибите се преглеждат всеки ден през периода на извършване на теста и всички външни аномалии (като кръвоизлив, промяна на цвета) и ненормално поведение следва да бъдат отбелязвани. Всеки случай на смърт се описва и мъртвата риба се отстранява, колкото е възможно по-скоро. Мъртвата риба не се заменя, ако скоростта на концентрация и плътност на биомасата са достатъчни, за да се избегне въздействие върху растежа чрез изменения в броя на рибите в аквариума. Въпреки това, порцията храна е необходимо да бъде регулирана.

2. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Препоръчва се включването на статистик, както при планирането, така и при анализа на теста, доколкото методът за извършване на теста позволява значителни изменения при планирането, като например при броя на аквариумите за тестване, броя на тестваните концентрации, броя на рибите, и т.н. С оглед на наличните възможности при планирането на теста, тук не се дават специфични насоки върху статистическата процедура.

▼ B

Скоростта на растежа не следва да се изчислява за съдове за тестване, когато смъртността надвишава 10 %. Обаче нивото на смъртност се определя за всички тествани концентрации.

Който и метод да се използва за анализ на данните, основната формула е специфичната скорост на растеж r за периода между t_1 и t_2 . Това може да се определи по няколко начина, в зависимост от това, дали рибата е отделно маркирана или не, и от това, дали се изисква обикновен аквариум.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

където,

r_1 = е индивидуалната специфична скорост на растежа

r_2 = е средната за аквариума специфична скорост на растеж

r_3 = е „псевдо“ специфичната скорост на растеж

W_1, W_2 = са теглото на отделната риба при време съответно t_1 и t_2

$\log_e w_1$ = е логаритъм на теглото на отделната риба при започване на изследователския период

$\log_e W_2$ = е логаритъм на теглото на отделната риба при завършване на периода на изследване

$\log_e W_1$ = е средната стойност на логаритмите на показателя w_1 за рибите в аквариума в началото на изследователския период

$\log_e W_2$ = е средната стойност на логаритмите на показателя W_2 за рибите в аквариума в края на изследователския период

t_1 и t_2 = е времето (дните) в началото и в края на периода на изследване

r_1, r_2, r_3 могат да се изчисляват за период от 0—28 дни и когато е подходящо (т.е. когато се прави измерване на четиринадесетия ден) за периоди от 0—14 и 14—28 дни.

2.1.1. Анализ на резултатите, получени чрез регресия (моделиране на концентрация—реакция)

Този метод на анализ отговаря на подходящи математически съотношения между специфичната скорост на растеж и концентрация и следователно позволява изчисляване на EC_{50} т.е. всички необходими стойности на ЕС. Използването на този метод на изчисляване на r за отделната риба (r_1) не е необходимо и вместо това анализът може да се основава на средната стойност за аквариум r (r_2). Последният метод се предпочита. Подходящ е и в случаите, когато се използват най-малките видове.

Средната за аквариума специфична скорост на растеж (r_2) се чертае графично спрямо концентрацията с цел да се провери отношението концентрация—реакция.

▼ B

За да се изрази отношението между r_2 и концентрацията, следва да се използва подходящ модел и неговият избор трябва да се подкрепи със съответните аргументи.

Ако броят на оцелелите във всеки аквариум риби не е еднакъв, тогава, за да се пригоди моделът, се натоварва, независимо дали е прост или не линеален, с цел да се обхванат групи с различни размер.

Методът за подбиране на модела трябва да дава възможност да се направи оценка например на EC_{20} и на дисперсията (или стандартна грешка или доверителен интервал). Графиката на изобразения модел следва да бъде показана във връзка с данните, така че да може да се види в каква степен е пригоден моделът (8) (18) (19) (20).

2.1.2. Анализ на резултатите от оценката на LOEC

Ако текстът включва дублиране на аквариума на всички нива на концентрация, оценката на LOEC може да се основава на анализа за променливост (ANOVA) на средната за аквариума специфична скорост на растеж (вж. точка 2.1), последван от подходящ метод (т.е. тестът на Дънет и Уилям (12) (13) (14) (21) за сравняване на средното r за всяка концентрация със средното r за контрола с цел да се определи най-ниската концентрация, за която тази разлика е значителна при възможно ниво от 0,05. Ако не се намери изискваната предпоставка за параметричен метод, с цел да се преобразуват данните към хомогенна променливост преди извършването на ANOVA или по време на извършване на ANOVA за теглото, се обръща внимание на ненормалното разпределение (например теста на Шапиро—Уилк) или хетерогенната променливост (тест на Бартлет).

Ако тестът не включва дублиращ аквариум за всяка концентрация, ANOVA, основана на аквариума, ще бъде невъзможна или слабочувствителна. В такава ситуация, се прави допустим компромис на основата на ANOVA върху „псевдо“ специфичната скоростна растеж r_3 за отделната риба.

Средната r_3 за всяка тествана концентрация може тогава да се сравни с средната r_3 за контролите. LOEC тогава може да бъде определено, както преди това. Трябва да се признае, че този метод не дава възможност нито за допустимост, нито за защита срещу разликите между аквариумите, извън тази, която се отчита за разликите между отделните риби. Обаче практиката показва (8), че променливостта между аквариумите е много малка в сравнение с тази в аквариумите (т.е. между рибите). Ако отделната риба не е включвана в анализа, се посочват метода за определяне на рязко отличаваща се стойност и причините за неговата употреба.

2.2. ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Резултатите се тълкуват внимателно, когато измерените токсични концентрации на тестваното вещество се появят на ниво, близко до определената от аналитичния метод граница, или при полустатичните тестове, когато концентрацията на тестваното вещество се увеличава за времето между току-що приготвения разтвор и преди подновяването.

2.3. ДОКЛАДВАНЕ НА ТЕСТА

Докладването на теста трябва да включва следната информация:

▼B**2.3.1. Тествано вещество:**

- физична природа и съответните физико-химични свойства;
- данни за химична определеност включително чистота и аналитичен метод за проверка на тестваното вещество, когато е приложимо.

2.3.2. Тествани видове:

- научно наименование, по възможност;
- род, размер, доставчик и предварителна обработка, и т.н.

2.3.3. Условия за извършване на теста:

- използвана процедура на тестване (например полустатична/ възобновима, при течение, скорост на концентрацията, плътност на биомасата и т.н.);
- проектиране на теста (например брой на съдовете за теста, тестваната и дублираща концентрация, брой на рибите в отделен съд);
- метод на подготовка на основния разтвор и честотата на сменяне (трябва да се посочени разтварящия фактор и неговата концентрация, когато се използват);
- номиналната тествана концентрация, средствата за изчисляване на стойностите и техните отклонения при съдовете за теста и метода, чрез който те са постигнат и доказателство, че тези мерки се отнасят за концентрацията на тестваното вещество в истинския разтвор;
- характеристика — разтворимост във вода: рН, твърдост, алкалност, температура, концентрация на разтворен кислород, нива на остатъци от хлор (ако се измерени), общо количество органичен въглерод, разтворени частици, соленост на тестваната среда (ако се измерва) е всички други направени измервания;
- качество на водата в съда за тестване: рН, твърдост, температура и концентрация на разтворен кислород;
- подробна информация за храненето (например вида на храната, даденото количество и честота).

2.3.4. Резултати:

- доказателство, че контролната група изпълнява валидния критерий за оцеляване, както и данни за смъртността при всички нива на тестваната концентрация;
- използваните статистически техники за анализ, статистика, основана на дублирането или на рибите, обработване на данните и обосноваване използването на тези техники;
- таблични данни за индивидуалното и средното тегло на рибата за дните 0, 14 (ако са изчислени) и 28 стойности от средната за аквариума или „псевдо“ специфичната скорост на растеж (при необходимост) за периодите 0—28 дни или по възможност 0—14 и 14—28 дни,
- резултати от статистическите анализи (т.е. регресионен анализ или ANOVA) за предпочитане в таблична и графична форма и съответно LOEC ($p = 0,05$) и NOEC и EC_x по възможност със стандартна грешка,

▼B

— разпространяване на необичайни реакции на рибите и всички видими ефекти, появили се в резултат от тестваното вещество.

3. ПРЕПРАТКИ

- (1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.
- (2) Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.
- (3) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. *Chemosphere*, 14, pp. 1855—1870.
- (4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. *Ecotox. Environ. Safety*, 21, pp. 157—164.
- (5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.
- (6) Holcombe, G. W., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Conta. Toxicol.* 28, pp. 287—297.
- (7) Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series PA-600/3-91-063. USE nvironmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.
- (8) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium*, ASTM STP 891, R. C. Bahner and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 328—338.
- (9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 pp.
- (10) Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.
- (11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10—12 December 1991.
- (12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, *J. Amer. Statist. Assoc.* 50, pp. 1096—1121.
- (13) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, pp. 482—491.

▼B

- (14) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, pp. 103—117.
- (15) Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. *Aquaculture* 120, pp. 123—133.
- (16) Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 37, pp. 33—41.
- (17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in *Testbook of Fish Health*. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.
- (18) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, pp. 1485—1494.
- (19) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.
- (20) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the Icp approach. USE nvironmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assessment Center. Sept. 1988. 12 pp.
- (21) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, pp. 510—531.

ВИДОВЕ РИБИ, ПРЕПОРЪЧАНИ ЗА ТЕСТВАНЕ И ПОДХОДЯЩИ УСЛОВИЯ ЗА ИЗВЪРШВАНЕ НА ТЕСТА

Видове	Препоръчителна температура (°C)	Излагане на светлина (в часове)	Препоръчително първоначално тегло на рибата (g)	Изисквана прецизност на измерването	Скорост на концентрацията (g/l)	Плътност на биомасата (за литър)	Храна	Продължителност на теста (дни)
Препоръчани видове:								
<i>Oncorhynchus mykiss</i> дъгова пъстърва	12,5—16,0	12—16	1—5	Най-близо до 100 mg	1,2—2,0	4	Патентовани пържени храни от сушени съомги	≥ 28
Други добре документирани видове:species:								
<i>Danio rerio</i> риба зебра	21—25	12—16	0,050—0,100	Най-близо до 1 mg	0,2—1,0	5—10	Сурова храна (<i>Brachionus Artemia</i>)	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> оризова риба (Медака)	21—25	12—16	0,050—0,100	Най-близо до 1 mg	0,2—1,0	5—0	Сурова храна (<i>Brachionus Artemia</i>)	≥ 28

▼B*Приложение 2***НЯКОИ ХИМИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ДОПУСТИМАТА
РАЗТВОРИМОСТ ВЪВ ВОДА**

Вещество	Концентрация
Твърди частици	< 20 mg/l
Общ органичен въглерод	< 2 mg/l
Нейонизиран амоняк	< 1 µg/l
Утайка от хлор	< 10 µg/l
Общи органофосфорни пестициди	< 50 ng/l
Общи органохлоридни пестициди плюс полихлоринатен бифенил	< 50ng/l
Общ органичен хлор	< 25 ng/l



Приложение 3

логаритмични серии на концентрации, подходящи за извършване на токсичен тест (9)

Колона (номер на концентрация между 100 и 10, или между 10 и 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	65	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Серия от пет (и повече) успешни концентрации може да бъде избрана от една колона. Средните точки между концентрации в колона (x) се намират в колона (2x + 1). Изброените стойности могат да представят концентрации, изразени като процент на количество или като тегло (mg/l или µg/l). Стойностите могат да се умножават или делят на всички степени на 10, както е подходящо. Колона 1 може да се използва, ако е имало значителна несигурност за нивото на токсичност.

▼B

B.15. РИБИ, КРАТКОСРОЧЕН ТЕСТ ЗА ТОКСИЧНОСТ ПРИ ЕМБРИОНИТЕ И ИНДИВИДИТЕ В СТАДИЙ НА ХРАНЕНЕ ОТ ЖЪЛТЪЧНАТА ТОРБИЧКА

1. МЕТОД

Този метод за изследване на субхроничната орална токсичност е точно копие на ОИСП TG 212 (1998).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Този краткосрочен метод за тестване токсичността върху рибните ембриони и индивидите в стадий на хранене от жълтъчната торбичка е краткосрочен тест, при който се излагат етапите на живот от новоизлюпеното яйце до края на стадия на хранене от жълтъчната торбичка. Не се извършва хранене при тестовете върху ембрионите и индивидите в стадий на хранене от жълтъчната торбичка и следователно тестът трябва да бъде приключен, докато новоизлюпените все още се хранят от жълтъчната торбичка.

Очаква се тестът да определи леталните и, в ограничена степен, сублеталните въздействия на химикалите върху определени стадии и тествани видове. Този тест дава полезна информация, че може: а) да се образува мост между леталните и сублетални тестове, б) да се използва като екранен тест или за тест на целия ранен стадий на живот или за тест на хроничната токсичност, и в) да се използва като тестване на видове, при които техниките на отглеждане не са достатъчно добре развити за да покриват периода на промените от ендогенно до екзогенно хранене.

Следва да се има предвид, че само тестовете, които инкорпорират в себе си всички стадии от цикъла на живот на рибите, обикновено са надеждни при даване на точна преценка за хроничната токсичност на химикалите при рибите, и че всякакво редуциране на излагането с оглед на жизнените стадии може да намали чувствителността и така да се подцени хроничната токсичност. Следователно се очаква тестът върху ембриона и новоизлюпените да е по-малко чувствителен от теста за целия ранен стадий на живот, по-специално по отношение на химикалите с висока липофилност ($\log P_{ow} > 4$) и химикали със специфичен начин на действие на токсичността. Обаче по-малките разлики в чувствителността между двата теста може да се очакват при химикали с неспецифичен, наркотичен начин на действие (1).

Преди публикуването на този тест, по-голямата част от опита с ембриони и новоизлюпени е придобит със сладководните риби *Danio rerio* (риба зебра) Hamilton-Buchanan (teleostei, cyprinidae — общо наименование на риба зебра). По-подробни насоки по извършването на този тест за тези видове е следователно даден в приложение 1. Това не ограничава употребата на други видове, с които също има натрупан опит (таблицы IA и IB).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Най-ниска концентрация на въздействие (ЛОЕС): е най-ниската тествана концентрация от тестваното вещество, при която се наблюдава значително въздействие от страна на веществото (при $p < 0,05$), при сравнение с контролата. Въпреки това, всички тествани концентрации над ЛОЕС трябва да имат вредно въздействие равно на или по-голямо от това, наблюдавано при ЛОЕС.

Концентрация на ненаблюдавано въздействие (НОЕС): това е тестваната концентрация непосредствено под ЛОЕС.

▼B

1.3. ПРИНЦИП НА ПРОВЕЖДАНЕ НА ТЕСТА

Ембрионът и новоизлюпените при рибите се излагат на различна степен на концентрация на тестваното вещество, разтворено във вода. По протокол е възможен избор между полустатичната и потоквата процедурата. Изборът зависи от вида на тестваното вещество. Тестът започва чрез поставяне на оплоденото яйце в тестваните камери изследване и се определя точно преди жълтъчните торбички на всички ларви във всички помещения за тестване да са напълно абсорбирани и преди да започне измиране в резултат на пълен глад при контролите. Леталните и сублетални ефекти се оценяват и се сравняват с контролния параметър с цел да се определи най-ниското наблюдавано въздействие на концентрация и следователно ненаблюдаваното въздействие на концентрацията. Друга възможност е те да се анализират чрез използване на метод на регресия с цел да се извърши оценка на концентрацията, която би причинила дадения процент въздействие (т.е. LC/EC_x , където x е определено въздействие в проценти).

1.4. ИНФОРМАЦИЯ ЗА ТЕСТВАНОВОТО ВЕЩЕСТВО

Следва да са на разположение и резултатите от теста за акутната токсичност (виж метод В.1), за предпочитане извършен с избраните за този тест видове. Резултатите могат да са полезни при избора на подходяща степен на тествана концентрация при теста в ранните стадии на живот. Следва да са известни разтворимостта във вода (включително разтворимост във тестваната вода) и парното налягане на тестваното вещество. Следва да е на разположение и надежден аналитичен метод за характеризиране на веществото в тествания разтвор, чрез известна и отчетена точност и чрез ограничение на разпространението.

Информацията, която е необходима за създаването на условията на провеждане на теста, включва структурната формула, чистота на веществото, устойчивост на светлина, устойчивост при условията на теста, pK_a , P_{ow} и резултатите от теста за готовност за биоразграждане (вж. метод В.4).

1.5. ВАЛИДНОСТ НА ТЕСТА

Тестът е валиден, ако са налице следните условия:

- цялостно оцеляване на оплодените яйца в контролните групи и по отношение на съдовете само с разтвор, то трябва да бъде по-голямо или равно на ограниченията, определени в приложения 2 и 3;
- концентрацията на разтворен кислород трябва да бъде между 60 и 100 % от степента на въздушно насищане по време на извършването на теста;
- температурата на водата не трябва да се различава с повече от $\pm 1,5^\circ\text{C}$ между тестваните камери или през последователни дни по време на теста, и следва да е в температурния обхват, определен за тестваните видове (приложения 2 и 3).

▼B**1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗВЪРШВАНЕ НА ТЕСТА****1.6.1. Тестови камери**

Може да се използват всякакъв вид стъклени или химически неутрални съдове. Размерите на съдовете следва да са достатъчно широки, за да съответстват на плътността на биомасата (вж. точка 1.7.1.2). Препоръчва се помещенията, в които се извършва тестът, да са разположени на случаен принцип в зоната на извършване на теста. Когато има систематични въздействия в лабораторията, които могат да се контролират чрез блокиране, се предпочита поддръждане на случаен принцип на стендовете за изпитване, като във всеки стенд са представени всички извършващи се обработки, преди напълно хаотичното поддръждане. Ако се използва блокиране, то се взема предвид при последващи анализи на данните. Тестовите камери следва да са защитени от нежелани смущения по време на работата.

1.6.2. Избор на видове риби

Видовете риби, които се препоръчват, са посочени в таблица 1А. Това не ограничава използването на други видове (например посочените в таблица 1Б), но се налага приспособяване на процедурата за извършване на теста, за да се получат подходящите условия. В този случай следва да се отчита основанието за избор на отделните видове и на експерименталния метод.

1.6.3. Съхраняване на стадо риби за размножаване

Подробности относно съхраняването на стадо при задоволителни условия могат да се намерят в ОИСП TG 210 ⁽¹⁾ и в препратки към използваната литература (2) (3) (4) (5) (6).

1.6.4. Третиране на ембрионите и ларвите

Ембрионите и ларвите могат да се излагат, вътре в основния съд за извършване на теста, в по-малки съдове, имащи странични и дънни отвори, за да се позволи оттичане на тестовия разтвор през съда. Може да се предизвика слабо течение през тези малки съдове чрез спирането им с ръчка, монтирана да премества съда нагоре и надолу, но запазвайки винаги организмите потопени под вода; може да се използва система за промиване чрез сифон. Оплодените яйца на риби от семейството на съомгата могат да се запазват с решетки и сито с достатъчно широки отвори, които да позволяват на ларвите да преминават през тях след излюпването. Целесъобразна е употребата на пипетка за цялостно всекидневно възстановяване на ембрионите и ларвите при полустатичните тестове (вж. параграф 1.6.6).

Когато контейнерите с яйца, решетките и ситата са били използвани, за да се задържат яйцата в основния съд за извършване на теста, тези ограничители се премахват след излюпването на ларвата ⁽¹⁾, с изключение на ситата, които следва да се задържат, за да се предотврати изпускането на рибите. Ако има нужда от прехвърляне на ларвите, те следва да не се излагат на въздух и не следва да се използват мрежи, да за се освободи рибата от контейнерите с яйцата (такава предпазливост може да не е наложителна при някои не толкова чувствителни видове, например при шарана). Времетраенето на това преместване се променя в зависимост от видовете и това преместване не винаги е необходимо. За полустатичните техники могат да се използват чаши от химическо устойчиво стъкло и плитки съдове и ако е необходимо, оборудвани със сито, което е леко повдигнато над ръба на чашата. Ако обемът на тези съдове е достатъчен за условията за плътност, (вж. 1.7.1.2) не е необходимо преместване на ембрионите и ларвите.

⁽¹⁾ ОИСП, Париж, 1992 г., Ръководство за извършване на изследвания 210, „Риби, изследване на токсичността в началните стадии“.

▼ B**1.6.5. Вода**

Всички води, които отговарят на химичните характеристики за приемливо разреждане с вода, както са изброени в приложение 4 и в които тестваните видове показват контролирана жизнена способност най-малко толкова добра, колкото описаната в приложения 2 и 3, са води, подходящи за използване при изследването. Необходимо е постоянно качество на водата по време на изследването. РН следва да остане в границите от $\pm 0,5$ рН на единица. За да се гарантира, че водата, която служи за разтвор, няма да повлияе прекомерно на резултатите от изследването (например чрез образуване на комплексни съединения на тестваното вещество) или да навреди на стадото риби, анализите се правят на интервали. Следва да се измерват тежките метали (например Cu, Pb, Zn, Hg, Cd и Ni), основните аниони и катиони (например Ca, Mg, Na, K, Cl и SO₄), пестициди (например органичния фосфор, и общо съдържание на органични пестициди), общо съдържание на органичен въглерод и разтворими частици, например на всеки три месеца, в случаите, когато водата, която се използва като разтвор, е известно, че има относително постоянни качества. Ако качеството на водата е постоянно поне за период, по-голям от една година, изчисленията могат да се правят по-рядко и да се увеличат интервалите (например на всеки шест месеца).

1.6.6. Разтвори за теста

Разтворите за теста при избрана концентрация се приготвят чрез разреждане на основния разтвор.

Основният разтвор се приготвя за предпочитане чрез просто смесване и разбъркване на тестваното вещество във водата, която се използва като разтвор, като се използват механични средства (например разклащане или с помощта на ултразвук). За постигане на подходящо концентриран основен разтвор, могат да се използват колоните на насищане/разтворимост. Доколкото е възможно следва да се избегне употребата на разтворители и диспергиращи (разтварящи) агенти; Обаче може в някои случаи да наложи употребата на такива съединения с цел да се получи подходящ концентриран основен разтворител. Примери за подходящи разтворители са ацетон, етанол, метанол, диметилсулфооксид, диметилформамид и триетиленгликол. Примери за подходящи диспергиращи агенти са Cremophor RH40, Tween 80, метилцелулоза 0,01 % и HCO-40. Внимава се при употребата на готови биоразграждащи вещества (например ацетон) и/или високо летливи съединения, тъй като могат да причинят проблеми с бактериалното натрупване при потоковите тестове. Когато се използва разтварящ агент, не трябва да оказва значително въздействие върху жизнената способност, нито да има видими вредни ефекти върху ранните стадии от жизнения цикъл, проявени при контролите само с разтвор. Въпреки това, следва да се положат всички усилия, за да се избегне употребата на такива материали.

При полустатичните техники могат да се следват две различни процедури за възстановяване: или i) се приготвят нови разтвори за изследване в чисти съдове или жизненоспособните яйца и ларви внимателно се пренасят в нови съдове с малко количество от стария разтвор, избягвайки излагането на въздух, или II) тестваните организми се запазват в съдовете, докато поне три четвърти от водата за теста не се смени. Честотата на средното подновяване ще зависи от устойчивостта на тестваното вещество, но се препоръчва всекидневна смяна на водата. Ако от първоначалните тестове за устойчивост (вж. точка 1.4), е видно, че концентрацията на тестваното вещество не е стабилна (т.е. извън номиналните стойности от 80—120 % или пада под 80 % от измерената първоначална концентрация) по време на периода на смяна, то трябва да се предвиди използването на потоков тест. Във всеки случай следва да се полагат грижи за избягване на стрес при ларвите по време на действията по смяна на водата.



За потоковите тестове се изисква система, която постоянно дозира и разрежда основния разтвор на тестваното вещество (например измерваща помпа, пропорционален разреждател, напоителни системи), за да се прехвърлят серии от концентрации към тестовите камери. Параметрите на изтичането на основния разтвор и разредената вода се проверяват на интервали, за предпочитане всеки ден, по време на извършването на теста и през това време не се променя с повече от 10 %. Счита се, че скорост на течението равна на поне пет обема на помещението за тестване за 24 часа е подходяща.

1.7. ПРОЦЕДУРА

Публикуваните научни изследвания дават полезна информация за извършване на теста при рибния ембрион и новоизлюпеното, като някои примери са включени в раздела за използвана литература към настоящия текст (7) (8) (9).

1.7.1. Условия на експозиция

1.7.1.1. Продължителност

За предпочитане е изследването да започне до 30 минути след като яйцето е било оплодено. Ембрионите се потапят предварително в разтвора или колкото е възможно по-скоро след започване стадия на делене на бластодиск и при всички случаи преди началото на стадия на гаструлата. За яйца, получени от търговски доставчик, може да не е възможно тестът да започне веднага след оплождането. Тъй като чувствителността на теста може да бъде сериозно засегната чрез забавяне началото на изследването, самото тестване следва да започне в период от осем часа след оплождането. Тъй като ларвите не се хранят по време на експозиционния период, тестът следва да завърши точно преди жълтъчните торбички на всички ларви във всички камери за извършване на изследването да са се абсорбирали напълно, или преди да се появи смъртност в резултат на глад при контролните групи. Продължителността зависи от видовете, които се използват при изследването. Някои препоръки относно продължителността са дадени в приложения 2 и 3.

1.7.1.2. Зареждане

Броят на оплодените яйца в началото на изследването следва да е достатъчен, за да отговаря на статистическите изисквания. През време на третирането те следва да са разпределени на случаен принцип и поне 30 оплодени яйца, разделени по равно (или на колкото е възможно по-равно, като се има предвид, че може да е трудно да се постигне еднаквост при стадата риби, когато се използват някои видове), следва да бъдат използвани за всяка концентрация между поне три дублиращи камери за тестване. Скоростта на зареждане (биомаса на обем тестван разтвор) следва да е достатъчно ниска с цел да се поддържа без вентилация концентрация на разтворения кислород от поне 60 % от степента на въздушно насищане. За потоковия тест се препоръчва скорост на дозиране не по-голяма от 0,5 g/l за 24 часа и не повече от 5 g/l от разтвора по всяко време (2).

1.7.1.3. Светлина и температура

Продължителността на излагане на светлина и водната температура следва да са подходящи за тестваните видове (приложения 2 и 3). За наблюдение на температурата може да се окаже подходящо използването на допълнителни съдове за тестване.

▼B**1.7.2. Тествани концентрации**

Обикновено се изискват пет концентрации на тестваното вещество разпределени с постоянен коефициент, който не превишава 3,2. Кривата относно LC_{50} за периода на излагане при акутното проучване следва да се има предвид, когато се избира обхвата на тестваната концентрация. Употребата на по-малко от пет концентрации, например при тест за определяне на граници, както и по-тесни интервали на концентрация, може да са подходящи при определени обстоятелства. Представят се причините, довели до използването на по-малко от пет концентрации. Не е нужно да се изследват концентрации на тестваното вещество по-високи от LC_{50} или 100 mg/l за 96 часа, независимо кое от двете е по-ниско. Веществата не трябва да се тестват над техния лимит на разтворимост на веществото във водата за изследване.

Когато коефициентът на разтворимост се използва при подготовката на основния разтвор (вж. точка 1.6.6), неговата последна концентрация в съда за тестване следва да не бъде по-висока от 0,1 ml/l и следва да бъде същата при всички съдове за тестване.

1.7.3. Контроли

Една контролна серия с водата, която се използва като разтвор (дублирана при необходимост) и, ако е уместно, една контролна серия, съдържаща разтворител, следва да бъдат включени допълнително към тестваните серии.

1.7.4. Честота на аналитичните установявания и измервания

По време на теста концентрациите на тестваното вещество се определят на равни интервали от време.

При полустатичните тестове, където концентрацията на тестваното вещество се очаква да остане в номиналната стойност от $\pm 20\%$, (т.е. в стойности 80—120%; вж точки 1.4 и 1.6.6), се препоръчва като минимум да се анализират най-високата и най-ниската концентрация на теста, когато след като са приготвени и незабавно преди възстановяването в поне три момента, разположени равномерно по време на теста (т.е. анализи се правят върху образец от същия разтвор — когато е току-що приготвен и възстановен).

За тестове, където концентрацията на тестваното вещество не се очаква да остане в номиналната стойност от $\pm 20\%$ (на основата на данни за стабилността на тестваното вещество), е необходимо да се анализират всички тествани концентрации, след като са приготвени и при подновяването, но като се следва същия режим (т.е. в поне три момента, разположени равномерно по време на теста). Определянето на концентрацията на веществото, което се изследва, преди подновяването, е необходимо да се извърши само при един от дублиращите съдове за всяка концентрация. Определянето на концентрациите се прави с разлика от не повече от седем дни. Обаче ако е налице доказателство, което показва, че концентрацията на тестваното вещество в разтвора е била задоволително постигната при $\pm 20\%$ от номиналната стойност или е измерена първоначална концентрация на тестваното вещество по време на извършването на изследването, тогава резултатите могат да се основават на номинала или на измерените първоначални стойности.

За потокови тестове, подобен режим на взимане на проби е подходящ като този, описан за полустатичните тестове, (но измерване на „стари“ разтвори не се прилага в този случай). Обаче ако продължителността на теста е повече от седем дни, може да се препоръча увеличаване броя на вземането на пробите през първата седмица (например три измервания) за да се гарантира, че концентрациите от тестваното вещество са останали устойчиви.

▼ B

Може да се появи нужда от центрофугиране или филтриране на пробите (например използвайки 0,45 µm размер на порите). Обаче, тъй като нито центрофугирането, нито филтрирането разделят винаги небιологичните частици от биологичните, пробите може да не подлагат на тези третираня.

По време на теста следва да бъдат измервани разтвореният кислород, рН и температурата от всеки съд за тестване. Общата твърдост и соленост (ако е подходящо) се измерват при контролните органи и съда с най-висока концентрация. Като минимум разтвореният кислород и солеността (ако е подходящо) се измерват три пъти (в началото, средата и края на теста). При полустатичните тестове се препоръчва разтвореният кислород да се измерва по-често, за предпочитане преди и след всяка смяна на водата или поне веднъж на седмица. Измерването на рН става в началото и след всяка смяна на водата при полустатичните тестове и поне веднъж в седмицата при потоквите тестове. Твърдостта и алкалността се измерват поне веднъж по време на теста. Температурата следва да се измерва всекидневно и за предпочитане се наблюдава продължително поне при един съд по време на теста.

1.7.5. **Наблюдения**1.7.5.1. *Стадий на развитие на ембриона*

Стадият на развитие на ембриона (т.н. гастрюла) се проверява колкото може по-прецизно в началото на излагането на тестваното вещество. Това може да се направи като се използват представителни проби на яйца, запазени и изчистени по подходящ начин. Използваната литература също съдържа данни за описанието и илюстрирането на стадията на развитие на ембриона.

1.7.5.2. *Излюпване и жизнена способност*

Наблюденията върху излюпването и жизнената способност се правят поне веднъж на ден и се записва броя на излюпените индивиди. Желателно е да се правят по-чести наблюдения в началото на теста (на всеки 30 минути по време на първите три часа), тъй като в някои случаи времето за оцеляване може да бъде от по-голямо значение, отколкото броят на мъртвите екземпляри (например при остри токсични въздействия). Мъртвите ембриони и ларви се отстраняват веднага след като са забелязани, тъй като могат да се разложат бързо. При отстраняването на мъртвите индивиди се полага изключителна грижа да не се ударят и да не се наранят физически близкостоящите яйца/ларви, които са изключително деликатни и чувствителни. Критериите за смърт варират в зависимост от стадия на съществуване:

- **при яйцата:** по специално в ранните стадии това са: забелязана загуба на прозрачност и изменение в оцветяването, причинени от сгъстяване и/или утаяване на протеини, водещи до бял непрозрачен вид,
- **при ембрионите:** липса на движенията на тялото и/или липса на сърдечен ритъм и/или непрозрачно обезцветяване при вид, чиито ембриони са нормално прозрачни,
- **при ларвите:** неподвижност и/или липса на дихателни движения и/или липса на сърдечен ритъм и/или бял непрозрачно оцветяване на централната нервна система и/или липса на реакции при механични стимуланти.

▼ B1.7.5.3. *Аномалия във външния вид*

Броя на ларвите, които показват аномалии във формата на тялото и/или пигментацията и стадия на абсорбция на жълтъчната торбичка се записват на подходящи интервали, зависещи от продължителността на теста и вида на описаната аномалия. Следва да се отбележи, че аномалните ембриони и ларви се появяват по нормален начин и могат да бъдат от порядъка на няколко процента от контролните серии при някои видове. Аномалните животни следва да се отстраняват от съда за тестване само при смърт.

1.7.5.4. *Аномално държание*

Аномалните състояния, като хипервентилация, некоординирано плуване и нетипично състояние на покой, се записват на адекватни интервали в зависимост от продължителността на теста. Тези ефекти, въпреки трудността да се определи тяхното количество, когато се наблюдават, могат да помогнат при тълкуването на данните за смъртността т.е. да дадат информация за начина, по който се проявява токсичното действие на веществото.

1.7.5.5. *Дължина*

В края на теста, се препоръчва измерване дължината на индивидите; може да се използва стандартна, разклонена и обща дължина. Ако обаче се появят гниене на опашния плавник и разяждане на перката, се използва стандартната дължина. В повечето случаи при добре извършените тестове, коефициентът на променливост на дължината между дублиращите серии и контролните е $\leq 20\%$.

1.7.5.6. *Тегло*

В края на теста може да се измери индивидуалното тегло; тегло в сухо състояние (24 часа при 60 °C) е за предпочитане пред мокро тегло (пълно изсушаване). В повечето случаи при добре извършените тестове, коефициентът на променливост на теглото между дублиращите серии и контролните е $\leq 20\%$.

Тези наблюдения ще повлияят на някои или всички на следните данни, които са на разположение за статистическия анализ:

- обща смъртност;
- брой на здравите ларви на края на теста;
- време на започване на излюпването и края му (т.е. 90 % излюпване във всяка репликация),
- брой на ларвите, които се излюпват всеки ден;
- дължина (и тегло) на оцелелите животни в края на теста;
- брой на ларвите, които са деформирани или са с аномален вид;
- брой на ларвите, проявили аномално държание.

▼ B**2. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ****2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Препоръчва се да бъде включен и статистик и при проектирането и при анализа на теста, тъй като методът позволява значителна променливост при проектирането на експеримента като например брой на тестовите камери, брой на тестваните концентрации, начален брой на оплодените яйца и измерените параметри. От гледна точка на наличните възможности при проектирането на теста тук не се дават специфични насоки по статистическите процедури.

Ако LOEC/NOECs трябва да се измерват, необходимо е да се анализира променливостта във всяка дублираща серия, като се използва анализ на средното отклонение (ANOVA) или процедури за създаване на таблици за непредвидените случаи. С цел да се направи многократно сравнение между резултатите на индивидуалните концентрации и тези за контролните органи, метода на Дънет може да бъде полезен (12) (13). Други полезни примери също са на разположение (14) (15). Размерът на въздействието, който може да се установи като се използва ANOVA или други процедури (т.е. показател на теста), се измерва и отчита. Следва да се отбележи, че не всички наблюдения, изброени в точка 1.7.5.6, са подходящи за статистическия анализ, използващ ANOVA. Например общата смъртност и броят на здравите ларви в края на теста се анализират, като се използват безпогрешни методи.

Ако трябва да се измерват LC/EC_x, подходяща крива(и), например логистична крива следва да се нагоди, така че да съответства точно на данните, които са от интерес за изследването, чрез използване на статистически метод като последните квадрати или нелинейни последни квадрати. Кривата(ите) се измерва така, че съотношението LC/EC_x и неговите стандартни грешки да могат да се изчислят директно. Това много ще улесни изчисляването на границите на сигурност около LC/EC_x. Освен ако няма основателни причини да се предпочетат различни граници на сигурност, позоваването става при двустранна сигурност от 95 %. Процедурите по съответствие следва преди всичко да предоставят средството за оценяване значението на липсата на съответствие. Могат да се използват графичните методи на съответстващи си криви. Регресионният анализ е подходящ за всички наблюдения, изброени в точка 1.7.5.6

2.2. ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Резултатите следва да се тълкуват внимателно, когато измерените токсични концентрации в тестваните разтвори са на ниво, което е близко до границата на разпространение на аналитичния метод. Тълкуването на резултатите за концентрациите над водната разтворимост на веществата също се прави внимателно.

2.3. ОТЧИТАНЕ НА ТЕСТА

Резултатите от теста трябва да включват следната информация:

2.3.1. Тествано вещество

- физична природа и съответните физико-химични свойства;
- данни за химична определеност, включително чистота на състава и аналитичен метод за проверка на тестваното вещество, при необходимост.

▼ B**2.3.2. Тествани видове:**

- научно наименование, род, брой на родителски риби (т.е. колко женски са използвани, за да се осигури необходимия брой яйца за теста), източник и метод на събиране на оплодените яйца, и последващите излюпвания.

2.3.3. Условия за извършване на теста:

- използваната процедура на тестване (например полустатична или потокова, времето от оплождането до започването на теста, зареждането и т.н.);
- фотопериод(и);
- планиране на теста (например брой на тестовите камери и дублиращите серии, брой на ембрионите в една дублираща серия);
- метод на подготовка на основния разтвор и честотата на сменяне (трябва да се посочени разтворителя и неговата концентрация, когато се използват);
- номиналната тествана концентрация, измерените стойности средствата за изчисляване на стойностите и техните отклонения в съдовете за теста и методът, чрез който те са постигнати и ако тестваното вещество се разтваря във вода при концентрация по-ниска от тестваната, следва да се представи доказателство, че тези мерки се отнасят за концентрацията на тестваното вещество в разтвора;
- характеристика разтворимост във вода: рН, твърдост, температура, концентрация на разтворен кислород, нива на остатъци от хлор (ако се измерени), общо органичен въглерод, разтворени частици, соленост на тестваната среда (ако се измерва) и всички други направени измервания;
- качество на водата в съда за тестване: рН, твърдост, температура и концентрация разтворен кислород.

2.3.4. Резултати:

- резултати от предварителните проучвания за устойчивостта на тестваното вещество;
- доказателство, че контролните серии отговарят на стандартите всички допустими критерии за оцеляване на тестваните видове (приложения 2 и 3);
- данни за смъртността/оцеляването в етапите на ембриони и ларви и общата смъртност/оцеляване;
- данни за излюпването и броя на излюпените;
- данни за дължината (и теглото);
- разпространение и описание на морфологични отклонения, ако има такива;
- разпространение и описание на въздействието върху държането, ако има такова;
- статистически анализ и обработка на данните,
- за тестове анализирани чрез ANOVA, най-ниската концентрация с наблюдаван ефект (LOEC) като $p = 0,05$ и концентрация с ненаблюдавано въздействие (NOEC) за всяка оценена реакция, включително описание на използваните статистически процедури и индикация за размера на въздействието, която може да се определи;

▼B

— за тестове, анализирани чрез регресионни техники, LC/EC_x и интервалите на сигурност, и диаграма за използваните модели за тяхното изчисляване;

— обяснение на всички отклонения от този метод на тестване.

3.

ПРЕПРАТКИ

- (1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.
- (2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.
- (3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121—173.
- (6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328—330.
- (7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61—71.
- (8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807—821.
- (9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129—145.
- (10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.
- (11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.
- (12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096—1121.
- (13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482—491.
- (14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

- (15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. *Aquatic Toxicology*, 16, pp. 321—334.
- (16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 pp.
- (17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch. Of Environmental Contamination and Toxicology*, 21, pp. 126—134.
- (18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology — an invitation to the comparative methods. *Proc. Royal Society of London, Series B*, 252: pp. 231—236.
- (19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32, pp. 19—28.
- (20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. *Environ. Tox. Chem.* 10, pp. 1189—1203.
- (23) Calow P. (1993). *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.
- (24) Balon E. K. (1985). *Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives*, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.
- (25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., *Fish Physiology*, Vol. XIA, Academic press, pp. 1—58.

Таблица 1А

Видове риби, които се препоръчват за използване при тестове

СЛАДКОВОДНИ

<i>Oncorhynchus mykiss</i> дъгова пъстърва (9) (16)
<i>Danio rerio</i> риба зебра(7) (17) (18)
<i>Cyprinus caprio</i> шаран (8) (19)
<i>Oryzias latipes</i> японска оризова риба (медака)(20) (21)
<i>Pimephales promelas</i> рибка бодливка (8) (22)



Таблица 1Б

Примери за други добре документирани видове, които също могат да се използват

СЛАДКОВОДНИ	СОЛЕНОВОДНИ
<i>Carassius auratus</i> Златна рибка (8)	<i>Menidia peninsularae</i> Крайбрежна дребна риба (23) (24) (25)
<i>Lepomis macrochirus</i> Риба луна (8)	<i>Clupea harengus</i> Херинга (24) (25)
	<i>Gadus morhua</i> Риба треска (24) (25)
	<i>Syprinodon variegatus</i> Рибка бодливка (23) (24) (25)

*Приложение 1***РЪКОВОДСТВО ЗА ИЗВЪРШВАНЕ НА ТЕСТОВЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ
ВЪРХУ ЕМБРИОНИТЕ И ИНДИВИДИТЕ В СТАДИЯ НА ХРАНЕНЕ
ОТ ЖЪЛТЪЧНАТА ТОРБИЧКА НА РИБА ЗЕБРА (*BRACHYDANIO
RERIO*)****ВЪВЕДЕНИЕ**

Рибата зебра произлиза от Короманделския бряг на Индия, където обитава бързотечащи потоци. Това е обикновена аквариумна риба от семейство „Шарани“ и информация за начините на нейното отглеждане и развъждане може да се намери в съответните книги за тропическите риби. Нейните биологически особености и използването ѝ в проучвания за рибарството се разглеждат от Лаале (1).

Рибата рядко надвишава 45 mm дължина. Тялото е цилиндрично със 7—9 тъмносини хоризонтални сребристи ивици. Тези ивици достигат до опашния плавник и перките. Гърбът е маслиненозелен. Мъжките индивиди са по-тънки от женските. Женските индивиди са по-сребристи и коремната област е разширена, преди всичко заради хвърлянето на хайвера.

Възрастните риби са способни да устоят на големи колебания в температурата, рН и твърдостта. Обаче, за да има здрави риби, които снасят яйца от добро качество, следва да се осигурят оптимални условия.

По време на изхвърлянето на хайвера мъжките преследват и блъскат женските и, тъй като яйцата са изхвърлени, те се оплождаат. Яйцата, които са прозрачни и не са лепкави, падат на дъното, където могат да бъдат изядени от родителите. Изхвърлянето на хайвера се влияе от светлината. Ако сутрешната светлина е подходяща, обикновено рибите изхвърлят хайвера си в ранните часове на следващото разсъмване.

Женският индивид може да произведе групи от по няколко стотина яйца на седмични интервали.

**УСЛОВИЯ ЗА РИБИТЕ РОДИТЕЛИ, ВЪЗПРОИЗВЕЖДАНЕ И РАННИ
СТАДИИ НА СЪЩЕСТВУВАНЕ**

Избират се подходящ брой здрави риби и се запазват в подходяща вода (т.е. приложение 4) в продължение на поне две седмици преди очакваното изхвърляне на хайвера. Групата от риби се храни поне веднъж преди произвеждането на групата яйца, използвани при теста. Гъстотата на рибите по време на този период не следва да надвишава 1 g риба на литър. Редовната смяна на водата или използването на почистващи системи дава възможност да се увеличи гъстотата. Температурата на аквариума се поддържа на нивото от 25 + 2 °C. Рибата се подлага на различни хранителни режими, които могат да съдържат например подходяща суха храна от търговската мрежа, живи току-що уловени солнечни раци, *Chronomids*, *Daphnia*, бели червеи (*Enchytraeids*).

По-долу са описани две процедури, които на практика водят до достатъчен брой здрави, оплодени яйца, за да се извърши теста:

- i) Осем женски и 16 мъжки индивида се поставят в аквариум, съдържащ 50 литра вода с разтвор, защитени от директна светлина и се оставят необезпокоявани колкото е възможно повече, в продължение на най-малко 48 часа. Ваната за събиране на хайвера се поставя на дъното на аквариума следобед в деня, предшестваш началото на теста. Ваната съдържа прегради (плексиглас или други подходящи материали), с 5—7 cm височина с 2—5 mm груба мрежа, прикрепена отгоре, както и 10—30 µm фина мрежа на дъното. Няколко „дървета от хайвер“, които се състоят от разплетено найлоново въже, са прикрепени към грубата мрежа на рамката. След като рибите са били оставени 12 часа на тъмнина, се пуска слаба светлина, която предизвиква изхвърлянето на хайвера. От два до четири часа след изхвърлянето на хайвера, ваната се отстранява и се събират яйцата. Ваната не позволява рибите да изядат яйцата и в същото време дава възможност за лесното им събиране. Групата от риби следва да е хвърляла хайвер поне веднъж преди изхвърлянето на хайвера, от които се използват яйца за тестване.

▼B

- ii) От 5 до 10 мъжки и женски индивида се настаняват поотделно поне две седмици преди очакваното изхвърляне на хайвер. След 5—10 дни коремната област на женските индивиди се разширява и техните генитални папили стават видими. Мъжките риби нямат папили. Изхвърлянето на хайвера става в съответен аквариум, оборудван с лъжливо дъно с решетка отгоре (като е посочено по-горе). Аквариумът се пълни с вода с разтвор, така че дълбочината на водата над решетката да е 5—10 cm. Един женски и два мъжки индивида се поставят в този аквариум един ден преди очакваното изхвърляне на хайвера. Температурата на водата се повишава постепенно до един градус над температурата за аклиматизация. Светлината се изгасва и аквариумът се оставя колкото е възможно без външно въздействие. На сутринта се пуска лека светлина, която предизвиква изхвърляне на хайвера. След 2—4 часа рибите се отстраняват и яйцата се събират. Ако има нужда от по-голям брой яйца, отколкото може да се получи от една женска, може паралелно да се подготвят достатъчен брой аквариуми за хайвер. Чрез записване на постигнатата репродуктивност на женския индивид преди теста (размера на групата и качеството), тези женски, които са с най-висока репродуктивност могат да се изберат за отглеждане.

Яйцата се пренасят в съда за изследване чрез използване на стъклени тръби (вътрешен диаметър не по-малък от 4 mm), снабдени с еластично мехурче за изсмукване. Количеството вода, което се пренася заедно с яйцата, е колкото е възможно по-малко. Яйцата са по-тежки от водата и потъват извън тръбата. Полагат се грижи, за да се предпазят яйцата (ларвите) от контакт с въздуха. Следва да се извърши микроскопско изследване на пробите от групата, за да се гарантира, че няма неточности в първите стадии на развитие. Не се разрешава дезинфекция на яйцата.

Скоростта на смъртност при яйцата е най-висока през първите 24 часа след оплождането. Смъртност от 5—40 % е често наблюдавана през този период. Яйцата се израждат в резултат от неуспешно оплождане или развитие. Качеството на групата яйца зависи от женския индивид, тъй като някои женски постоянно произвеждат яйца с добро качество, а други никога не произвеждат доброкачествени яйца. Скоростта на развитие и на излюпване също зависи от различните групи. Обикновено над 90 % от успешно оплодените яйца и ларвите в жълтъчната торбичка оцеляват. При 25° С яйцата се излюпват 3—5 дни след оплождането и жълтъчната торбичка се абсорбира приблизително 13 дни след оплождането.

Развитието на ембриона е добре описано от Хизаока и Батъл (2). Благодарение на прозрачността на яйцата и ларвите след излюпването, може да се следи развитието на рибата и да се наблюдава наличието на дефекти. Приблизително четири часа след изхвърлянето на хайвера, неоплодените яйца могат да се различат от оплодените (3). При това изследване яйцата и ларвите се поставят в съдове за тестване с малък обем и се изучават под микроскоп.

Условията за извършване на теста, които се прилагат в ранния стадий, са изброени в приложение 2. Оптималните стойности за рН и за твърдост на водата, съдържаща разтвора, са 7, 8 и съответно 250 mg CaCO₃/l.

ИЗЧИСЛЕНИЯ И СТАТИСТИКА

Предлага се двустепенен подход. Първо се анализират статистически данните за смъртността, анормалното развитие и времето на изхвърляне на хайвера. След това за тези концентрации, при които не са били определен вредни ефекти по никой от тези параметри, статистически се изчислява дължината на тялото. Този подход се препоръчва, тъй като токсикантите могат селективно да убият по-малките риби, да забавят времето за изхвърляне на хайвера и да предизвикат основни дефекти, което води до измървания на наклонената дължина. Освен това ще е налице приблизително същият брой риби, който трябва да бъде измерен за една обработка при гарантиране на валидността на тестваното вещество.

▼BLC₅₀ И EC₅₀ ФОРМУЛИ

Процентът на оцелелите яйца и ларви се изчислява и се коригира за смъртността при контролите съгласно формулата на Абот (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100 \right)$$

където,

P = коригиран процент оцелели

P' = процент на оцелели, наблюдавани в тестваната концентрация

C = процент оцелели в контролната серия

Ако е възможно, LC₅₀ се определя чрез подходящ метод в края на теста.

Ако е желателно включването на морфологичните аномалии в статистическите данни за EC₅₀, могат да се намерят насоки при Стефан (5).

ОЦЕНКА НА LOEC И NOEC

Една от целите на изследването на яйцата и индивидите в стадия на изхранване от жълтъчната торбичка, е да се направи сравнение на нулевите концентрации с контролата, т.е. да определи LOEC. Следователно могат да се използват процедури за многократно сравняване (6) (7) (8) (9) (10).

ПОЗОВАВАНИЯ

- (1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, pp. 121—173.
- (2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 pp.
- (3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebraabärling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173—181.
- (4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1—333.
- (5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69—81.
- (6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096—1121.
- (7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482—491.
- (8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103—117.
- (9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519—531.
- (10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

УСЛОВИЯ ЗА ИЗВЪРШВАНЕ НА ТЕСТА, ПРОДЪЛЖИТЕЛНОСТ И КРИТЕРИИ ЗА СПОСОБНОСТТА ЗА ОЦЕЛЯВАНЕ ПРИ ПРЕПОРЪЧАНИТЕ ВИДОВЕ

ВИДОВЕ	Температура (°C)	Соленост (0/00)	Период на излагане на светлина (часове)	Продължителност на периода (дни)		Типична продължителност на теста	Оцеляване на контролите (минимум %)	
				ембриони	торбичка		успешно изхвърляне на хайвер	след изхвърлянето на хайвера
СЛАДКОВОДНИ								
<i>Brachydanio rerio</i> риба зебра <i>DANIORERIO</i>	25±1	—	12–16	3–5	8–10	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гастрюла) до 5 дни след изхвърлянето на хайвера (8–10 дни)	80	90
<i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i> дъгова пъстърва	10±1 ⁽¹⁾ 12±1 ⁽²⁾	—	0 ^(*)	30–35	25–30	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гастрюла) до 20 дни след изхвърлянето на хайвера (50–55 дни)	66	70
<i>CYPRINUS CAPRIO</i> шаран	21–25	—	12–16	5	>4	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гастрюла) до 4 дни след изхвърлянето на хайвера (8–9 дни)	80	75
<i>ORYZIAS LATIPES</i> японска оризова риба	24±1 ⁽¹⁾ 23±1 ⁽²⁾	—	12–16	8–11	4–8	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гастрюла) до 5 дни след изхвърлянето на хайвера (13–16 дни)	80	80
<i>PIMEPHALES ROMELAS</i> рибка бодливка	25±2	—	16	4–5	5	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гастрюла) до 4 дни след изхвърлянето на хайвера (8–9 дни)	60	70

⁽¹⁾ За ембриони.

⁽²⁾ За ларви.

^(*) Тъмнина за ембриони и ларви до една седмица след изхвърлянето на хайвера, с изключение на времето, когато се наблюдават. По-късно по време на теста намалена светлина.

Условия за извършване на теста, продължителност и критерии за способността за оцеляване при препоръчаните видове

Видове	Температура (°C)	Соленост (0/00)	Период на излагане на светлина (часове)	Продължителност на периода (дни)		Типична продължителност на теста	Оцеляване на контролите (минимум %)	
				ембриони	торбичка		успешно изхвърляне на хайвер	след изхвърлянето на хайвера
СЛАДКОВОДНИ								
<i>Carassius auratus</i> златна рибка	24 ± 1	—	—	3—4	>4	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гастрала) до 4 дни след изхвърлянето на хайвера (7 дни)	—	80
<i>Lepomis macrochirus</i> риба луна	21 ± 1	—	16	3	>4	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гастрала) до 4 дни след изхвърлянето на хайвера (7 дни)	—	75
СОЛЕНОВОДНИ								
<i>Menidia pensuatae</i> крайбрежна дребна риба		15—22	12	1,5	10	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гастрала) до 5 дни след изхвърлянето на хайвера (6—7 дни)	80	60
<i>Clupea harengus</i> херинга	10±1	8—15		20—25	3—5	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гастрала) до 3 дни след изхвърлянето на хайвера (23—27 дни)	60	80
<i>Gadus morhua</i> риба треска	5 ± 1	5—30	12	14—16	3—5	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гастрала) до 3 дни след изхвърлянето на хайвера (18 дни)	60	80
<i>Syprinodon variegates</i> рибка бодливка	25 ± 1	15—30	12	—	—	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гастрала) до 4/7 дни след изхвърлянето на хайвера (28 дни)	>75	80

▼B*Допълнение 4***НЯКОИ ХИМИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ДОПУСТИМ РАЗТВОР
ВЪВ ВОДАТА**

ВЕЩЕСТВО	КОНЦЕНТРАЦИИ
ПРАХОВИ ЧАСТИЦИ	< 20 mg/l
ОБЩ ОРГАНИЧЕН ВЪГЛЕРОД	< 2 mg/l
НЕЙОНИЗИРАН АМОНЯК	< 1 µg/l
ОСТАТЪЦИ ОТ ХЛОР	< 10 µg/l
ОБЩИ ОРГАНОФОСФОРНИ ПЕСТИЦИДИ	< 50 ng/l
ОБЩИ ОРГАНОХЛОРНИ ПЕСТИЦИДИ ПЛЮС ПОЛИХЛОРЕН БИФЕНИЛ	< 50 ng/l
ОБЩ ОРГАНИЧЕН ХЛОРИН	< 25 ng/l

▼B

B.16. МЕДОНОСНА ПЧЕЛА — ТЕСТ ЗА ОСТРА ОРАЛНА ТОКСИЧНОСТ

1. МЕТОД

Този метод за изследване на острата токсичност е точно копие на ОИСП TG 213 (1998).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Този тест за токсичност при медоносните пчели-работнички е лабораторен метод, планиран с цел да се оцени оралната остра токсичност на продуктите за защита на растенията и други химикали.

При оценката и изчисляването на токсичните характеристики на веществата може да се изисква определяне на острата орална токсичност при медоносните пчели, т.е. когато е възможно излагане на пчелите на даден химикал. Тестът за острата орална токсичност при пчелите се извършва, за да се определи присъщата токсичност на пестицидите и други химикали по отношение на пчелите. Резултатите от този тест следва да се използват за определяне необходимостта от по-нататъшна оценка. По-специално този метод може да се използва при програмите за оценка на риска от пестициди при пчелите, основана на последваща прогресия от лабораторни тестове за токсичност до експерименти в полуполеви и полеви условия (1). Пестицидите могат да се изследват като активни вещества или като образувани продукти.

Използва се стандарт за токсичност, за да се провери чувствителността на пчелите и прецизността на процедурата по извършване на теста.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Остра орална токсичност: представлява вредните ефекти, които се появяват при максимална продължителност от 96 часа (h) на орално приемане на отделна доза от тестваното вещество.

Доза: е сборът от консумираното тествано вещество. Дозата се изразява като съотношение на масата (μg) на тестваното вещество към тестваното животно ($\mu\text{g}/\text{пчела}$). Истинската доза за всяка пчела поотделно не може да се изчисли, тъй като пчелите се хранят колективно, но може да се изчисли една средна доза (общото консумирано тествано вещество/броя на тестваните пчели в една клетка).

LD₅₀ (средната летална доза) орална: това е статистически получената единична доза от веществото, която може да причини смърт при 50 % от животните, когато се приема през устата. Стойността на LD₅₀ се изразява в μg от тестваното вещество на пчела. За пестицидите тестваното вещество може да е или активно вещество, или образуван продукт, съдържащ едно или повече от едно активни вещества.

Смъртност: животното се записва като мъртво, когато е напълно неподвижно.

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОД НА ТЕСТВАНЕ

Възрастните медоносни пчели работнички (*Apis mellifera*) се излагат на серия дози от тестваното вещество, разпръснато в захаросан разтвор. След това пчелите се подлагат на същия хранителен режим, който не включва тестваното вещество. Смъртността се записва всеки ден по време на период от 48 часа и се сравнява с контролните стойности. Ако степента на смъртност се увеличи за период от 24 до 48 часа, докато контролната смъртност остава на приемливо ниво, т.е. < 10 %, е подходящо да се удължи продължителността на теста до максимум 96 часа. Резултатите се анализират, за да се изчисли LD₅₀ на двадесет и четвъртия и на четиридесет и осмия час, а в случаи на продължително изследване, на седемдесети втория и на деветдесет и шестия час.

▼ B**1.4. ВАЛИДНОСТ НА ТЕСТА**

За да бъде тестът валиден, прилагат се следните условия:

— средна смъртност за общия брой контроли не трябва да надвишава 10 % към края на теста;

— LD₅₀ на токсичните стандарти отговаря на специален обхват.

1.5. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ТЕСТВАНЕ**1.5.1. Избор на пчели**

Използват се младите възрастни пчели работници от един и същ род, т.е. пчели с една и съща възраст, начин на хранене, т.н. Пчелите се взимат от подходящо хранени, здрави и, доколкото е възможно, неболедевали колонии с пчела царица, чието минало и физиологически статус са добре познати. Те могат да се съберат сутринта или вечерта преди теста и да се държат при условията на тестване до следващия ден. Подходящи са пчели, събрани от пита без пилило. Събирането в ранна пролет или късна есен се избягва, тъй като пчелите изменят физиологията си през това време. Ако тестовите трябва да се проведат през ранна пролет или късна есен, пчелите могат да се сложат в инкубатор и да се развъждат за една седмица с „пчелен хляб“ (тичинков прашец, събран от медената пита) и захаросан разтвор. Пчелите, които са третирани с химични вещества като антибиотици, антивароа продукти и т.н., не се използват при тест за токсичност в продължение на четири седмици след края на последното третиране.

1.5.2. Условия на настаняване и хранене

Използват се клетки, които се почистват лесно и се проветряват добре. Могат да се използват всички подходящи материали, т.е. неръждаема стомана, телена решетка, пластмасови и дървени клетки за еднократна употреба, т.н. Предпочитат се групи от 10 пчели в клетка. Размерът на клетките за теста следва да съответства на броя на пчелите, т.е. да осигурява достатъчно пространство.

Пчелите се държат в тъмнина в експерименталната стая при температура от $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. По време на теста следва да се записва относителната влажност, която нормално е около 50—70 %. Процедурите по задържането, включително обработката и наблюденията могат да се провеждат при (дневна) светлина. За храна се използва захаросан разтвор във вода с крайна концентрация от 500 g/l (50 % w/v). По желание храната се дава след даването на тествана доза. Системата на хранене позволява записване на приеманата храна за всяка клетка (вж. точка 1.6.3.1). Може да се използва стъклена тръба (приблизително 50 mm дълга и 10 mm широка с тесен отвор от едната страна около 2 mm диаметър).

1.5.3. Подготовка на пчелите

Събраните пчели се разпределят произволно в клетките за теста, разположени произволно в помещението, където се извършва тестът.

▼B

Пчелите могат да се оставят гладни до два часа преди началото на теста. Препоръчва се на пчелите да не дава храна преди обработването, за да може пчелите да са в еднакво положение относно съдържанието в червата им при започването на теста. Умиращите пчели се изхвърлят и се заместват със здрави преди началото на теста.

1.5.4. Подготовка на дозите

Тестваното вещество е водна смес и може да бъде разсеяно пряко в 50 % захаросан разтвор. За техническите продукти и вещества с ниска водна разтворимост, могат да се използват разтворители като например органичен разтвор, емулгатор и диспергиращо вещество с ниска токсичност към пчелите (т.е. ацетон, диметилформамид, диметилсулфоксид). Концентрацията на разтворителя зависи от разтворимостта на тестваното вещество и следва да е еднаква при всички тествани концентрации. Обаче концентрацията на разтворителя от 1 % е в повечето случаи подходяща и не следва да бъде надвишавана.

Следва да се приготви подходящ контролен разтвор, т.е. където един разтвор или разтворител се използват за разтваряне на тестваното вещество, използват се и две отделни контролни групи: разтвор във вода и захаросан разтвор с разтворител/носител на концентрацията при дозиране на разтворите.

1.6. ПРОЦЕДУРА**1.6.1. Тествани и контролни групи**

Броят на тестваните дози и дублиращите дози следва да отговаря на статистическите изисквания за определяне на LD_{50} с 95 % граници на сигурност. Обикновено за теста се изискват пет дози в геометрична серия с коефициент, който не превишава 2,2 и покрива стойността за LD_{50} . Обаче факторът на разтворителя броят на концентрациите за дозиране трябва да се определи спрямо наклона на токсичната крива (доза в сравнение със смъртност) и като се вземе предвид статистическият метод, който е избран за анализиране на резултатите. Сведенията, събрани от тестовете, позволяват избор на подходящи концентрации на дозиране.

Минимум три дублиращи тестови групи, всяка с 10 пчели, се дозират с всяка от тестваните концентрации. Минимум три контролни тестови групи, всяка с 10 пчели, се добавят към сериите за тестване. Контролните групи следва също да бъдат включени във връзка с използването на разтворител/носител (вж. точка 1.5.4).

1.6.2. Стандарти за токсичност

Стандартът за токсичност се включва в сериите за тестове. Поне три дози се избират, за да се покрие очакваната стойност на LD_{50} . С всяка доза се използват минимум три дублиращи клетки, всяка съдържаща 10 пчели. Предпочитаният токсичен стандарт е диметоат, за който докладваната орална LC_{50} - 24 часа е в обхвата от 0,10—0,35 μg активно вещество/пчела (2). Обаче други токсични стандарти биха били приемливи, когато достатъчни данни могат да бъдат предоставени, за да се провери очаквания ефект от дозата (например паратион).

▼B**1.6.3. Експозиция****1.6.3.1. Приемане на дозата**

Всяка тестова група от пчели трябва да има 100—200 µg от 50 % захаросан разтвор във вода, съдържащ тестваното вещество при подходящо концентрация. Големият обем изисква за всички продукти с ниска разтворимост, ниска токсичност или ниска концентрация на образуването, тъй като захаросания разтвор трябва да бъде използван. Трябва да се наблюдава приетата от всяка група обработена храна. Веднъж консумирана (обикновено за 3—4 часа), храната се отстранява от клетката и се замества с друга, която съдържа само захаросан разтвор. След това получават захаросаните разтвори по желание. За някои съединения при по-висока концентрация отхвърлянето на тестваната доза може да има за резултат по-малко или липса на консумирана храна. След максимум 6 часа неконсумираната третирана храна се замества само със захаросан разтвор. Сумата на третираната консумирана храна се изчислява (например измерване на обема/количество на оставащата третирана храна).

1.6.3.2. Продължителност

Продължителността на теста за предпочитане е 48 часа след като тестваният разтвор е заменен само от захаросан разтвор. Ако смъртността продължи да се увеличава с повече от 10 % след първите 24 часа, продължителността на теста следва да се увеличи на максимума от 96 часа, при условие че контролната смъртност не превиши 10 %.

1.6.4. Наблюдения

Смъртността се записва на четвъртия час след началото на теста и след това на 24 и 48 часа (т.е. след даване на дозата). Ако се налага удължен период за наблюдения, се правят по-нататъшни оценки за интервал от 24 часа, до максимум от 96 часа, при условие че контролната смъртност не превиши 10 %.

Количеството консумирана храна на група се изчислява. Сравняването на количеството консумация на третираната и нетретирана храна за дадени 6 часа може да предостави информация за вкуса на третираната храна.

Всяко наблюдавано въздействие на аномално държание по време на теста се записва.

1.6.5. Тест с ограничение

В някои случаи (например, когато се очаква тестваното вещество да е с ниска токсичност) се извършват ограничени тестове, с използване на 100 µg активно вещество/пчела с цел да се демонстрира, че стойността на LC_{50} е по-висока от тази стойност. Същата процедура се използва, като се включат три дублиращи тестови групи за тествана доза, съответните контролни групи, оценка на количеството консумирана храна, подложена на обработване и използването на токсичния стандарт. Ако се появи смъртност, следва да се извърши цялостно проучване. Ако се наблюдава сублетално въздействие, то се записва (вж. точка 1.6.4).

▼B**2. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ****2.1. ДАННИ**

Данните се сумират в таблична форма, показвайки за всяка третирана група, както и за контролните и за групите със стандартна токсичност, броя на използваните пчели, смъртността за всеки наблюдаван период от време и броя на пчелите с аномално поведение. Анализирайте данните за смъртността чрез подходящи статистически методи (например точен анализ, изменяща се средна стойност и вероятност за биномно разпределение (3) (4)). Изобразете графично кривите, които отговарят на дозите по всяко препоръчано време за наблюдение и изчислете наклона на кривите и медианата на летални дози LD₅₀ с 95 % граници на сигурност. Коригирането на контролната смъртност може да се направи като се използва поправката на Абот (4) (5). Когато третираната храна не е изцяло консумирана, се определя дозата консумирано тествано вещество на група. LD₅₀ се изразява в µg от тестваното вещество за пчела.

2.2. ОТЧИТАНЕ НА ТЕСТА

Отчетът за теста трябва да съдържа следната информация:

2.2.1. Тествано вещество:

- физична природа и съответните физико-химични свойства (устойчивост във водата, парно налягане);
- данни за химична определеност включително структурната формула, чистота (т.е. за пестицидите определяне и концентрация на активното вещество(а)).

2.2.2. Тествани видове:

- научно наименование, род, приблизителна възраст (в седмици), метод на събиране, дата на събиране,
- информация за използваните колонии, от които се събират пчелите за теста, включително здравословно състояние, болести при възрастни индивиди, всякаква предварителна обработка и т.н.

2.2.3. Условия на теста:

- температура и съответната влажност на стаята за експеримента,
- условия на настаняване включително вид, размер и материал, от които са направени клетките,
- методи за подготовка на основния и тествания разтвор (разтворителят и неговата концентрация трябва да са дадени, когато се използват);
- методи за подготовка на основните разтвори и честота на подновяване (разтворителят и неговата концентрация трябва да са дадени, когато се използват);
- проектиране на метода, т.е. брой и използвани тествани концентрации, брой на контролите; за всяка тествана концентрация и контрола, брой на дублиращите клетки и брой на пчелите в клетка;
- дата на извършване на теста.

▼B**2.2.4. Резултати:**

- резултати от предварителното изследване за откриване на обхвата, ако е извършвано;
- груби данни: смъртност за всяка тествана доза за всяко наблюдавано време,
- диаграма на кривите за реакция спрямо дозите в края на теста;
- стойности на LD₅₀ с 95 % граници на сигурност за всяко време, препоръчано за наблюдение, за тестваното вещество и токсичния стандарт;
- статистически процедури, използвани за определяне на LD₅₀;
- смъртност при контролите;
- други биологически ефекти, наблюдавани или измерени т.е. аномално поведение на пчелите (включително изхвърляне на тестваната доза), количеството консумирана храна при третирани и нетретирани групи;
- всички отклонения от описаната процедура на теста и всяка друга, отнасяща се до това информация.

3. ПРЕПРАТКИ

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products ó Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151—165. March 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981—1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119—125.
- (3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99—113.
- (4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.
- (5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265—267.

▼B**B.17. МЕДОНОСНА ПЧЕЛА — ТЕСТ ЗА ОСТРА КОНТАКТНА ТОКСИЧНОСТ****1. МЕТОД**

Този метод за изследване на острата токсичност е точно копие на ОИСП TG 214 (1998).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Този текст за токсичност при медоносните пчели работнички е лабораторен метод, създаден за оценяване на острата контактна токсичност на продукти за растителна защита и други химикали.

При оценката и оценяването на токсичните характеристики на веществата, може да се изисква определяне на острата контактна токсичност при медоносните пчели, т.е. когато е възможно излагане на пчелите на даден химикал. Тестът за острата контактна токсичност се извършва за да се определи присъщата токсичност на пестицидите и други химикали за пчелите. Резултатите от този тест се използват за да се определи нуждата от по-нататъшна оценка. По-специално този метод може да се използва програмите за оценка на риска от пестициди при пчелите, основани на последваща прогресия от лабораторни тестове за токсичност до експерименти в полу-полеви и полеви условия (1). Пестицидите могат да се изследват като активни вещества или като образувани продукти.

Токсичният стандарт се използва за да се провери чувствителността на пчелите и прецизността на процедурата по извършване на теста.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Острата орална токсичност: представлява вредните ефекти, които се появяват за минимален период от 96 часа (h) при локално прилагане на отделна доза от веществото.

Доза: е сбора от прилаганото тествано вещество. Дозата се изразява като масата на тестваното вещество към тестваното животно (μg /пчела).

LD₅₀ (средната летална доза) контактна: това е статистически извлечената единична доза от веществото, която може да причини смърт при 50 % от животните, когато се приема чрез контакт. LD₅₀ стойност се изразява в μg от тестваното вещество на пчела. За пестицидите тестваното вещество може да е или активно вещество или образуван продукт, съдържащ едно или повече от едно активни вещества.

Смъртност: животното се записва като мъртво, когато е напълно неподвижно.

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОД НА ТЕСТВАНЕ

Възрастните медоносни пчели работнички (*Apis mellifera*) се излагат на серия дози от тестваното вещество, разтворено в подходящ носител чрез директно прилагане върху гръдния кош (капчици). Тестът продължава 48 часа. Ако нивото на смъртност се увеличи за период от 24 до 48 часа, докато контролната смъртност остава на приемливо ниво, т.е. $\leq 10\%$, подходящо е да се удължи продължителността на теста до максимум 96 часа. Смъртността се записва всеки ден и се сравнява с контролните стойности. Резултатите се анализират с цел да се изчисли LD₅₀ от 24 часа и 48 часа, а в случаи на продължено изследване на 72 часа и 96 часа.

▼B**1.4. ВАЛИДНОСТ НА ТЕСТА**

За да бъде тестът валиден, се прилагат следните условия:

- средната смъртност за общия брой контроли не трябва да надвишава 10 % в края на теста;
- LD₅₀ на токсичните стандарти отговаря на специалния обхват.

1.5. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ТЕСТВАНЕ**1.5.1. Избор на пчели**

Използват се млади възрастни пчели работници, т.е. пчели с една и съща възраст, начин на хранене, род и т.н. Пчелите се взимат от подходящо хранени, здрави и, доколкото е възможно, неболедували колонии с пчела царица, чието минало и физиологически статус са добре познати. Те могат да се съберат сутринта или вечерта преди теста и да се държат при условията на тестване до следващия ден. Подходящи са пчели събрани от пита без пипило. Събирането в ранна пролет или късна есен се избягва, тъй като пчелите изменят физиологията си през това време. Ако тестовите трябва да се проведат през ранна пролет или късна есен, пчелите могат да се сложат в инкубатор и да се развъждат за една седмица с „пчелен хляб“ (тичинков пращец, събран от медената пита) и захаросан разтвор. Пчелите, които са третирани с химични вещества като антибиотици, антивароа продукти и т.н., не се използват за тест за токсичност в продължение на четири седмици от края на последното третиране.

1.5.2. Условия на настаняване и хранене

Използват се клетки, които се почистват лесно и се проветряват добре. Могат да се използват всички подходящи материали, т.е. неръждаема стомана, телена решетка, пластмасови и дървени клетки за еднократна употреба, т.н. Размерът на клетките за теста следва да съответства на броя на пчелите, т.е. да осигурява достатъчно пространство. Предпочитат се групи от 10 пчели в клетка.

Пчелите се държат на тъмно в експерименталното помещение при температура от 25 ± 2 °C. По време на теста следва да се записва относителната влажност, която нормално е около 50—70 %. Процедурите по провеждането, включително обработката и наблюденията, могат да се провеждат при (дневна) светлина. За храна се използва захаросан разтвор във вода с крайна концентрация от 500 g/l (50 % w/v) и след тестваната доза храната се дава по преценка, като се използва хранилка за пчели. Това може да е стъклена тръба (приблизително 50 mm дълга и 10 mm широка с тесен отвор от едната страна с размер около 2 mm диаметър).

1.5.3. Подготовка на пчелите

Събраните пчели произволно се упоаяват с въглероден диоксид или амоняк за да се приложи тестваното вещество. Количеството използвано упоиващо вещество и времето на излагане са минимални. Умиращите пчели се изхвърлят и се заместват със здрави преди започването на теста.

1.5.4. Подготовка на дозите

Когато тестваното вещество се прилага като разтвор на носителя, т.е. органичен разтвор или воден разтвор с мокрещо вещество. За органичен разтворител се предпочита ацетон, но могат да се използват и други органични разтворители с ниска токсичност (например диметилформамид, диметилсулфоксид). За продукти, получени при разтваряне във вода и за високополярни органични вещества, които не се разтварят в органични разтвори преносители, разтварянето може да се улесни, ако се приготви в слаб разтвор на промишлено мокрещо вещество (например Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼ B

Следва да се приготви подходящ контролен разтвор, т.е. където един разтвор или разтворител се използват за разваряне на тестваното вещество, се използват и две отделни контролни групи: една третирана с вода и една с разтвор/дисперсант.

1.6. ПРОЦЕДУРА**1.6.1. Тествани и контролни групи**

Броят на тестваните дози и броят на дублиращите дози следва да отговарят на статистическите изисквания за определяне на LD_{50} с 95 % граници на сигурност. Обикновено за теста се изискват пет дози в геометрична прогресия с коефициент, който не превишава 2,2 и покрива стойността за LD_{50} . Обаче броят на дозите трябва да бъде определен по отношение на наклона на токсичната крива (доза спрямо смъртност) и като се взимат под внимание статистическият метод, който е избран за анализиране на резултатите. Тестовите за намиране на обхвата позволяват избор на подходящи концентрации на дозата.

Минимум три дублиращи тестови групи, всяка с 10 пчели, се дозират с всяка тествана концентрация.

Минимум три контролни групи, всяка от 10 пчели, действат допълнително и се включват към сериите за тестване. Ако се използват органичен разтворител или мокрещо вещество, се включват и три допълнителни контролни групи, всяка от 10 пчели за разтворителя или мокрещото вещество.

1.6.2. Стандарти на токсичност

Токсичният стандартът на токсичност трябва да се включи в тестовите серии. Избират се най-малко три дози, за да се обхване очакваната LD_{50} стойност. С всяка доза следва да се използват минимум три дублиращи клетки, всяка съдържаща 10 пчели. Предпочитаният токсичен стандарт е диметоат, за който докладваната контактна LC_{50} - 24 часа е в 0,10—0,35 μg активно вещество/пчела (2). Обаче други токсични стандарти биха били приемливи, когато достатъчно данни могат да бъдат предоставени, за да се провери очаквания ефект от дозата (например паратион).

1.6.3. Експозиция**1.6.3.1. Приемане на дозите**

Упоените пчели поотделно се третират чрез локално прилагане на тестваното вещество. Пчелите получават на случаен принцип различни тествани и контролни дози. Количество от 1 μg разтвор, съдържащ тестваното вещество при подходяща концентрация, се прилага с микроапликатор към гръбната част на торакса на всяка пчела. Ако са оправдани, се използват и други количества. След прилагането пчелите се разпределят по клетките и се захранват със захаросан разтвор.

1.6.3.2. Продължителност

За предпочитане е продължителност на теста от 48 часа. Ако смъртността продължи да се увеличава с повече от 10 % между първите 24 и 48 часа, продължителността на теста се увеличава на максимума от 96 часа, при условие че контролната смъртност не превиши 10 %.

▼B**1.6.4. Наблюдения**

Смъртността се записва на четвъртия час след започване на теста и след това на 24 и 48 часа (т.е. след даване на дозата). Ако се налага удължен период за наблюдения, се правят по-нататъшни оценки за интервал от 24 часа, до максимум от 96 часа, при условие че контролната смъртност не превиши 10 %.

Всяко наблюдавано въздействие на аномално държание по време на теста се записва.

1.6.5. Ограничен тест

В някои случаи (например когато се очаква тестваното вещество да е с ниска токсичност) се извършват ограничени тестове, като се използва 100 µg активно вещество/пчела с цел да се демонстрира, че стойността на LD₅₀ е по-голяма от тази стойност. Следва да се използва същата процедура чрез включване на три дублиращи тестови групи за тествана доза, съответните контролни групи и използването на токсичния стандарт. Ако се появи смъртност, следва да се извърши цялостно изследване. Ако се наблюдава сублетално въздействие, то се записва (вж. точка 1.6.4).

2. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ**2.1. ДАННИ**

Данните се сумират в таблична форма, като се посочва за всяка третирана група контролните и стандартно токсичните групи със стандартна токсичност, броят на използваните пчели, смъртността за всеки наблюдаван период от време и броят на пчелите с аномално поведение. Анализирайте се данните за смъртността чрез подходящи статистически методи (например точен анализ, подвижна средна стойност и вероятност за биномно разпределение) (3) (4). Изобразете графично кривите, които отговарят на дозите за всяко препоръчано време за наблюдение изчислява (т.е. 24, 48 и, ако е от значение, на 72 и 96 часа), и изчислете наклона на кривите и медианата на леталните дози (LD₅₀) с 95 % граници на сигурност. Коририрането на контролната смъртност може да се направи като се използва поправката на Абот (4) (5). LD₅₀ се изразява в µg от тестваното вещество за пчела.

2.2. ОТЧИТАНЕ НА ТЕСТА

Отчетът за теста трябва да съдържа следната информация:

2.2.1. Тествано вещество:

— физична природа и съответните физико-химични свойства (например устойчивост на водата, парно налягане);

— данни за химичната характеристика определеност включително структурната формула, чистота (т.е. при пестицидите определяне и концентрация на активното вещество(а)).

2.2.2. Тествани видове:

— научно наименование, род, приблизителна възраст (в седмици), метод на събиране, дата на събиране,

— информация за използваните колонии, използване за събиране на пчелите за теста, включително здраве и заболяване при възрастни индивиди, всякаква предварителна обработка и т.н.

▼B**2.2.3. Условия на теста:**

- температура и съответната влажност на експерименталното помещение;
- условия на настаняване включително вид, размер и материал, от който е направена клетката;
- методи за приемане на тестваното вещество, т.е. използваният носещ разтвор, количеството приложено тествано вещество, използваното упойващо вещество;
- проектиране на метода, т.е. броя и използваните тествани концентрации, броя на контролите; за всяка тествана концентрация и контрола, броя на дублиращите клетки и броя на пчелите в клетка;
- дата на извършване на теста.

2.2.4. Резултати:

- резултати от предварителното изследване за откриване на обхвата, ако е извършвано;
- груби данни: смъртност за всяка тествана доза при всяко наблюдавано време,
- диаграма на кривите на реакция към дозите в края на теста;
- стойности на LD₅₀ с 95 % граници на сигурност за всяко време, препоръчано за наблюдение, за тестваното вещество и стандарта на токсичност;
- статистически процедури, използвани за определяне на LC₅₀;
- смъртност при контролите;
- други биологически ефекти, наблюдавани или измерени, и аномално поведение на пчелите;
- всички отклонения от описаната процедура на метода на теста и всяка друга, отнасяща се до това информация.

3. ПРЕПРАТКИ

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products of Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151—165. March 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E. C., Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119—125.
- (3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99—113.
- (4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.
- (5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265—267.

▼B**V.18. АДСОРБЦИЯ/ДЕСОРБЦИЯ ЧРЕЗ ИЗПОЛЗВАНЕ МЕТОДА ЗА РАВНОВЕСИЕ В ГРУПАТА****1. МЕТОД**

Този метод е точно копие на ОИСП TG 106 за определяне на адсорбцията/десорбцията на почвата с използване на метода за равновесие в групата (2000).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Методът взима под внимание кръговите тестове и помещението за избор на почвата за извършване на теста за адсорбция (1) (2) (3) (4) и освен това съществуващите насоки на национално ниво (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Проучванията на адсорбцията/десорбцията са полезни за генериране на основната информация за подвижността на химикалите и тяхното разпространение в почвата, водата и въздуха (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Информацията може да се използва при предвиждане и изчисляване например наличността на химикали при разграждане, преобразуване и поглъщане от организмите (24); просмукване през повърхността на почвата (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28); изпаряемост от почвата (21) (29) (30); оттичане от повърхността на земята в естествените води (18) (31) (32). Могат да се използват данни за адсорбцията за сравнителни цели и моделиране (19) (33) (34) (35).

Разпространението на химикали между земната и водната фаза е сложен процес, който зависи от броя на различните фактори: химична природа на веществото (12) (36) (37) (38) (39) (40), характеристиките на почвата (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) и климатичните фактори като валежи, температура, слънчева светлина и вятър. Следователно многобройните явления и механизми, които са включени в процеса на адсорбция на химикалите от почвата, не могат напълно да се определят чрез обикновен лабораторен модел, какъвто е представения метод. Обаче, дори ако този опит не може да обхване всички възможни екологични случаи, той предоставя разнообразна информация за екологичната значимост на адсорбцията на дадено химично вещество.

Вижте също общия предговор.

1.2. ОБХВАТ

Методът цели изчисляване на адсорбцията/десорбцията на веществата в почвата. Целта е да се постигне стойност на сорбция, която може да бъде използвана при предвиждане на разделянето при различни екологични условия; за тази цел коефициентите на равновесие на адсорбцията за химикали при различни видове почви, се определя като функция на характеристиките на почвата (т.е. съдържание на органичен въглерод, съдържание на глина и строеж на почвата и рН). Трябва да се използват различни видове почви, за да се обхване колкото е възможно по-широко взаимодействието на даденото вещество с естествено появилите се почви.

В този метод адсорбция представлява процесът на съединяване на химикала с повърхността на почвата; той не прави разлика между различните процеси на адсорбция (физична и химична адсорбция) и тези процеси като катализирано разлагане на повърхността, адсорбция на основната маса и химична реакция. Не се взима предвид адсорбцията, която се появява при колоидалните частици (диаметър < 0,2 µm), генерирани от почвите.

▼B

Характеристиките на почвата, които са считат за най-важни за адсорбцията са: съдържание на органичен въглерод (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48); съдържание на глина и механична структура на почвата (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) и рН за съединенията, които могат да се йонизират (3) (4) (42). Другите характеристики на почвата, които могат да имат въздействие върху адсорбцията/десорбцията на определено вещество са капацитетът на действителния катионен обмен (ЕСЕС), съдържанието на аморфно желязо и алуминиеви оксиди, по-специално за вулканичните и тропически почви (4), както и за специфичните повърхности (49).

Проучването се планира, за да се извърши оценка на адсорбцията на химикалите върху различни видове почви с различно съдържание на органичен въглерод, глина и механична структура на почвата, и рН. Той обхваща три редици:

Фаза 1: Първоначално проучване с цел да се определи:

- отношението почва/разтвор;
- равновесно време на адсорбция и количеството тествано вещество, задържано на повърхността при равновесие;
- адсорбцията на тестваното вещество върху почвата в съдовете за тестване и устойчивостта на тестваното вещество по време на периода на проучване.

Фаза 2: Екранен анализ: адсорбцията се изучава при пет различни видове почви чрез адсорбна кинетика при една концентрация и определяне коефициента на разпространение K_d и K_{oc} .

Фаза 3: Определяне на адсорбните изотерми на Фройндлих, за да се определи въздействието на концентрацията върху обхвата на адсорбцията върху почвата.

Проучвания на десорбция чрез десорбна кинетика/десорбционни изотерми на Фройндлих (приложение 1).

1.3.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ЕДИНИЦИ

Символи	Определения	Единици
A_{t_i}	Процент адсорбция при време t_i	%
A_{eq}	Процент адсорбция при адсорбционно равновесие	%
$m_s^{ads}(t_i)$	Маса на тестваното вещество, адсорбирано върху почвата при време t_i	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	Маса на тестваното вещество, адсорбирано върху почвата при интервал от време Δt_i	μg
$m_s^{ads}(eq)$	Маса на тестваното вещество, адсорбирано върху почвата при адсорбно равновесие	μg
m_0	Маса на тестваното вещество в тръбата за тестване в началото на теста за адсорбция	μg
$m_m^{ads}(t_i)$	Маса на тестваното вещество измерено в аликвотна част при определено време t_i	μg
$m_{ap}^{ads}(ec)$	Маса на тестваното вещество в разтвор при адсорбционно равновесие	μg
m_{sol}	Количество почвена фаза, изразена чрез сухата маса на почвата	g

▼B

Символи	Определения	Единици
C_{sm}	Концентрация на масата на основния разтвор на веществото	$\mu\text{g cm}^{-3}$
C_0	Първоначална концентрация на масата на тествания разтвор при контакт с почвата	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{ap}^{ads}(t_i)$	Концентрация на масата веществото във водната фаза при адсорбиционно равновесие	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_s^{ads}(eq)$	Първоначално количество на водната фаза при контакта с почвата по време на теста за адсорбция	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{ap}^{ads}(eq)$	Концентрация на масата на веществото във водната фаза при време t_i и извършен анализ	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_0	Съдържание на веществото, задържано върху почвата при адсорбно равновесие	cm^3
V_a^A	Количество аликвотна част, в която се измерва тестваното вещество	cm^3
K_d	Коефициент на разпространение на адсорбцията	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{co}	Коефициент на нормализирана адсорбция на органичен въглерод	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{so}	Коефициент на нормализирано разпространение на органични частици	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{ads}	Коефициент на адсорбция на Фройндлих	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$1/n$	Степенен показател на Фройндлих	
D_{t_i}	Процент на десорбция при определено време t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	Процент на десорбция, съответстващ на интервала от време Δt_i	%
K_{des}	Коефициент на явна десорбция	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{des}	Коефициент на десорбция на Фройндлих	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$m_{ap}^{des}(t_i)$	Маса на тестваното вещество, десорбирано от почвата при време t_i	μg
$m_{ap}^{des}(\Delta t_i)$	Маса на тестваното вещество, десорбирано от почвата при интервал от време Δt_i	μg
$m_m^{des}(ec)$	Маса на веществото, определена аналитично във водната фаза при десорбно равновесие	μg
$m_{ap}^{des}(ec)$	Обща маса на веществото при десорбно равновесие	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	Маса на веществото, което остава адсорбирано върху почвата след интервал от време Δt_i	μg
m_{ap}^A	Маса на веществото, което остава отгоре от адсорбното равновесие заради непълен обем заместване	μg
$C_s^{des}(eq)$	Съдържание на веществото, задържано върху почвата при десорбно равновесие	$\mu\text{g g}^{-1}$



Символи	Определения	Единици
C_{ap}^{des} (ec)	Концентрация на масата тестваното вещество във водната фаза при десорбно равновесие	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_T	Общ обем на водната фаза в контакт с почвата по време на извършване на експеримента на десорбната кинетика с последователен метод	cm^3
V_R	Обем на плаващите отгоре частици, отстранени от тръбата след постигане на адсорбното равновесие и заместване със същия обем от 0,01 M CaCl ₂ разтвор	cm^3
V_a^D	Обем на аликвотната част, изпробвана за аналитични цели за време (i), през извършване на експеримента на десорбната кинетика с последователен метод	cm^3
V_r^i	Обем на разтвора, взет от тръбата (i) за изчисляване на тестваното вещество в експеримента на десорбционната кинетика (с паралелен метод)	cm^3
V_r^F	Обем на разтвора, взет от тръбата (i) за изчисляване на тестваното вещество при десорбно равновесие	cm^3
BM	Обемен баланс	%
m_E	Обща маса на тестваното вещество, извлечено от почвата и стените на съда за тестване в два етапа	μg
V_{rec}	Обем на откритите плаващи отгоре частици след адсорбционното равновесие	cm^3
P_{oa}	Коефициент на разделението октанол/вода	
pKa	Константа на разпадане Водоразтворимост	
S_a	Водоразтворимост	g l^{-1}

1.4 ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

Към пробите от почва с познато сухо тегло, което и било предварително блансирано от 0,01 M CaCl₂, се прибавят известни количества разтвор от тестваното вещество, не-етикетирани или радиоетикетирани при известна концентрация от 0,01 M CaCl₂. Сместа се разклаща за подходящо време. След това частиците почва се отделят чрез центрофуга и ако се нуждае се филтрират и се анализира водната фаза. Количеството адсорбирано тествано вещество върху пробите от почва се изчислява като разликата между количеството тествано вещество първоначално представено в разтвора и количеството, оставащо вещество в края на експеримента (индиректен метод).

Като вариант, количеството от адсорбирано тествано вещество може също директно да се определи чрез анализиране на почвата (директен метод). Тази процедура, която включва извличане на етапи на почвата с подходящ разтвор, се препоръчва в случаите, когато не може да се определи точно разликата в концентрацията на разтвора на веществото. Примери за такива случаи са: адсорбция на тестваното вещество върху повърхността на съдовете за тестване, неустойчивостта на тестваното вещество за времето на експеримента, слаба адсорбция, даваща само малко изменение в концентрацията на разтвора; и силна адсорбция произвеждаща ниска концентрация, която не може да бъде точно определена. Ако се използва радиоетикетирано вещество, може да се избегне извличане на почва чрез анализ на почвената фаза от изгаряне и сцинтилираща течност. Обаче сцинтилиращата течност е неспецифична техника, която не може да направи разлика между изходния и преобразуван продукт; следователно се използва, само ако тествания химикал е стабилен за периода на проучването.

▼ B

1.5. ИНФОРМАЦИЯ ЗА ТЕСТВАНТО ВЕЩЕСТВО

Химичните реактиви следва да са в аналитичен порядък. Препоръчва се използването на неетикетирани тествани вещества с известен анализ и за предпочитане поне 95 % чистота или използването на радиоетикетирани тествани вещества с известен състав и радиочистота. В случаи на индикатори за кратки периоди на полуразпадане се прилагат корекции на разпадане.

Преди извършването на теста за адсорбция—десорбция, следва да е налице следната информация:

- а) водоразтворимост (А.6);
- б) парно налягане (А.4) и/или константа на закона на Хенри;
- в) абиотично разлагане: хидролиза като функция на рН (В.7);
- г) коефициент на разделянето (А.8);
- д) готова биоразложимост (В.4) или аеробни и анаеробни трансформации в почвата;
- е) рКа на веществата, които могат да се йонизират;
- ж) директна фотолиза във водата (т.е. UV-Vis спектър на поглъщане във вода, квантов добив) и разпадане на светлината върху почвата.

1.6. ПРИЛОЖИМОСТ НА ТЕСТА

Тестът се прилага за химични вещества, за които с достатъчна точност се прилага аналитичния метод. Един от важните параметри, който може да повлияе на надеждността на резултатите, особено когато се следва индиректния метод, е устойчивостта на тестваното вещество по време на извършването на теста. Така необходимо условие е устойчивостта да се провери при предварителното изследване; ако се наблюдава изменение в скалата за време през периода на извършване на теста, се препоръчва основното изследване да се извърши чрез анализиране и на почвената и на водната фази.

Могат да се появят трудности при извършването на това изследване за тестваното вещество с ниска водоразтворимост ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$), както и за високозаредените вещества, заради факта, че концентрацията при водната фаза не може да бъде измерена аналитично с достатъчна точност. В тези случаи следва да се предприемат допълнителни стъпки. Насоки за това как да се справим с тези проблеми са дадени в съответния раздел за този метод.

Когато се изпитват летливи вещества, се полагат грижи да се избегнат загубите по време на проучването.

1.7. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.7.1 Апаратура и химични реактиви

Стандартно лабораторно оборудване, и по-специално следното:

- а) Тръби и съдове за извършване на експеримента. Важно е тези тръби и съдове да:
 - пасват директно на апарата за центрофуга, за да се сведат до минимум грешки при управлението и прехвърлянето;
 - са направени от инертни материали, които намаляват до минимум адсорбцията на тестваното вещество върху неговата повърхност.

▼B

- б) Разклащащо устройство: горен вибратор или еквивалентно оборудване; разклащащото устройство запазва почвата в разтвора по време на разбъркването.
- в) Центрофуга: за предпочитане високоскоростна, т.е. сила на центрофугиране > 3 000 g, контролирана температура, възможност да се отстраняват частиците с диаметър по-голям от 0,2 µm от водния разтвор. Контейнерите следва да са затворени по време на разклащането и центрофугата, за да се избегне изпаряване и загуби на вода; за да се избегне адсорбция, се използват дезактивирани капачки като тefлонова капачка с права резба.
- г) По избор: филтриращо устройство; филтри от 0,2 µm порьозност, стерилни, за еднократна употреба. Специално внимание са обръща на избора на филтриращ материал, за да се избегнат всякакви загуби от тестваното вещество; за ниско разтворимите тествани вещества, не се препоръчва органичен филтриращ материал.
- д) Аналитична контролно-измервателна апаратура, подходяща за измерване концентрацията на тестваните химикали.
- е) Лабораторна пещ, способна да поддържа температура от 103 °C до 110 °C.

1.7.2. Характеристика и избор на почви

Почвите се характеризират по три параметри, за които се счита, че от тях до голяма степен зависи капацитетът за адсорбция: органичен въглерод, съдържание на глина и структура на почвата, и рН. Както вече се спомена (вж. Обхват) и други физико-химични свойства могат да окажат влияние върху адсорбцията/десорбцията но отделните вещества и следва да се вземат предвид в такива случаи.

Методите, които се използват за характеризиране на почвите, са много важни и могат да имат значително въздействие върху резултатите. Следователно се препоръчва рН на почвата да бъде измерено в разтвор от 0,01 M CaCl₂ (това е разтворът, използван при тестване на адсорбцията/десорбцията) съгласно съответстващия ISO метод (ISO-10390-1). Също се препоръчва да се определят и други съответни свойства на почвата, съгласно стандартните методи (например ISO Наръчник на анализа на почвата); той разрешава анализа на данните за сорбция да са базирани на световните стандартизирани параметри на почвата. Някои ръководства за съществуващите стандартни методи за анализ на почвата и нейните характеристики са дадени в раздела използвана литература (50-52). За таригането на методите за изпитване на почвата се препоръчва употребата на почва за сравнение.

В таблица 1 е дадено ръководство за избор на почви при изследване на адсорбцията/десорбцията. Седемте избрани вида почви покриват видовете почва, които се срещат в умерените географски пояси. За тестваните вещества, които могат да се йонизират, избраните почви покриват широк интервал от рН с цел да е възможно изчисляване на адсорбция на веществото в неговите йонизирана и нейонизирана форми. Ръководство за това колко различни видове почви трябва да се използват при различните стадии от теста е дадено под 1.9 „Извършване на теста“.

Ако се предпочетат други видове почви, те се характеризират със същите параметри и следва да имат подобна променливост на свойствата, с тези, които са описани в таблица 1, дори и да не съответстват точно на критериите.



Таблица 1

Ръководство за избор на почви при изследване на адсорбцията/десорбцията

Вид на почвата	Обхват на pH (в 0,01M CaCl ₂)	Съдържание на органичен въглерод (%)	Съдържание на глина (%)	Структура на почвата (1)
1	4,5—5,5	1,0—2,0	65—80	глина
2	>7,5	3,5—5,0	20—40	песъчлива глина
3	5,5—7,0	1,5—3,0	15—25	утаечна глина
4	4,0—5,5	3,0—4,0	15—30	глинест льос
5	< 4,0—6,0 (2)	<0,5—1,5 (2), (3)	<10—15 (2)	глинест пясък
6	>7,0	<0,5—1,0 (2), (3)	40—65	песъчлива глина/глина
7	<4,5	>10	<10	пясък/глинест пясък

(1) Според ФАО и американската система (85).

(2) Съответните променливи следва да показват предимно стойности в дадения обхват. В случай обаче, че се появят трудности при намирането на подходящ почвен материал, приемат се стойности и под посочения минимум.

(3) Почви с наличие на по-малко от 0,3 % органичен въглерод могат да нарушат корелацията между органичното съдържание и адсорбцията. Следователно се препоръчва използването на почвите с минимално съдържание на органичен въглерод от 0,3 %.

1.7.3. Събиране и съхраняване на проби от почва

1.7.3.1. Събиране

Не се препоръчват никакви специални техники или средства за събиране на пробите; техниките за събиране на проби зависят от целта на проучването (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Следва да се вземе предвид:

- а) необходима ли е подробна информация за историята на площадката; това включва разположение, растителна покривка, обработка с пестициди и/или торове, биологични добавки и случайни замърсявания. Следват се препоръките на ISO стандарта за взимане проби от почвата (ISO 10381-6) по отношение на описанието на мястото, откъдето са взети пробите;
- б) мястото, откъдето са взети пробите, трябва да се определи чрез UTM или географските координати; това позволява повторно събиране на отделните почви за в бъдеще и може да помогне при определяне на почвите при различните класификационни системи, които се използват в различните страни. Освен това, следва да се събира само хоризонт А до максимум 20 cm дълбочина. Особено за вид почва п. 7, ако O_h хоризонтът е представен като част от почвата, той следва да се включи във взимането на проби.

Пробите от почва се транспортират като се използват контейнери и при определени температурни условия, които гарантират, че първоначалните свойства на почвата няма да се изменят значително.

▼ B**1.7.3.2. Съхраняване**

Предпочита се използването на току-що взети от площадката почви. Само ако това не е възможно, почвите могат да се съхраняват при температура на околната среда и се пазят изсушени на въздух. Не се препоръчва ограничаване на времето за съхраняване, но почви, които се съхраняват повече от три години се анализират отново преди употребата с оглед на тяхното съдържание на органичен въглерод, рН и СЕС (капацитетът на действителния катионен обмен).

1.7.3.3 Обслужване и подготовка на проби от почва за теста

Почвите се изсушават при въздух с температура на околната среда (за предпочитане между 20—25 °C). Отделянето на частиците се извършва с минимална сила, така че оригиналната структура на почвата да се измени колкото е възможно по-малко. Почвите се пресяват за частици с размер $\leq 2\text{mm}$; следват се препоръките на ISO стандарта за взимане проби от почвата (ISO 10381-6) по отношение на процеса на пресяване. Препоръчва се внимателно хомогенизиране, тъй като това повишава възпроизводимостта на резултатите. Съдържанието на влага за всяка почва се определя на три съизмерими части с нагряване от 105 °C, докато няма значително изменение в теглото (приблизително 12 часа). За всички изчисления масата на почвата се отнася до масата след изсушаване в пещ, т.е. от теглото на почвата се отстранява съдържанието на влага.

1.7.4. Подготовка на тестваното вещество за прилагане върху почвата

Тестваното вещество се разтваря в разтвор от 0,01 M CaCl_2 в дестилирана или дейонизирана вода; разтворът на CaCl_2 се използва като фаза на воден разтвор за да се подобри центрофугата и да се минимизира обмяната на катиони. Концентрацията на основния разтвор е за предпочитане да бъде три степени по-висока от границата на откриване при използване на аналитичния метод. Този праг запазва точни измерванията по отношение на методологията, следвана от този метод; в допълнение, концентрацията на основният разтвор следва да бъде под нивото на разтворимост на водата на тестваното вещество.

Основният разтвор за предпочитане се приготвя точно преди прилагането върху пробите от почва и се запазва затворен на тъмно при 4 °C. Времето на съхраняване зависи от устойчивостта на тестваното вещество и неговата концентрация в разтвора.

Само при слабо разтворимите вещества ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$) може да има нужда от подходящ разтварящ фактор, когато е трудно да се разтвори тестваното вещество. Това разтварящо вещество: а) се смесва с вода, както и с метанол и ацетонитрил; б) неговата концентрация не надвишава 1 % от общото количество на основния разтвор и е по-малка от тази в разтвора на тестваното вещество, което ще бъде в контакт с почвата (за предпочитане по-малко от 0,1 %); и в) да не е повърхностно активно вещество или да не влиза в солволизни реакции с тестваното вещество. Употребата на разтварящ агент се уговаря и обяснява при отчитането на данните.

Друга възможност за слабо разтварящите се вещества е да се добави тестваното вещество към системата на тестване чрез прибавяне: тестваното вещество е разтворено в органичен разтворител, аликвотната част на който се прибавя към почвената система и 0,01 M разтвор от CaCl_2 в дестилирана или дейонизирана вода. Съдържанието на органичния разтворител във водната фаза се запазва колкото е възможно по-ниско, обикновено не превишава 0,1 %. Прибавянето от органичен разтвор може да пострада от обема на неповторимост. Така може да се допуснат допълнителни грешки, тъй като тестваното вещество и концентрацията на коразтворителя няма да бъдат същите при всички изпитвания.

▼B**1.8. НЕОБХОДИМИ УСЛОВИЯ ЗА ИЗВЪРШВАНЕ НА ТЕСТА ЗА АДСОРБЦИЯ/ДЕСОРБЦИЯ****1.8.1. Аналитичен метод**

Основните параметри, които могат да повлияят върху точността за измерване на сорбцията, включват точност на аналитичния метод при анализ на разтвора и адсорбционната фаза, величината на изменение на концентрацията на разтвора, отношението почва/разтвор и измененията в структурата на почвата през време на равновесния процес (35) (59-62). Някои примери за точността са дадени в приложение 2.

Надеждността на използвания аналитичен метод трябва да се провери при стойност на концентрация, която е много вероятно да се получи по време на теста. Извършващият експеримента следва да се чувства свободен да използва подходящия метод с подходящата точност, прецизност, възпроизводимост, границата на откриваемост и възстановяване. Ръководство как се извършва такъв тест е дадено при експеримента по-долу.

Подходящо количество от 0,01 M CaCl₂, т.е. 100 cm³ се разбъркват 4 часа с почва, т.е. с тегло 20 g, на висока поглъщателна способност, т.е. с високо съдържание на органичен въглерод и глина; тези тежести и количества могат да варират в зависимост от аналитичните нужди, но отношението почва/разтвор от 1:5 е подходяща опорна точка. Сместа се центрофугира и водната фаза може да се филтрира. Определено количество тествано вещество основен разтвор се прибавя по-късно към първото, за да се постигне номинална концентрация със стойност, която е вероятно да се получи по време на теста. Това количество не превишава 10 % от крайното количество на водната фаза, с цел да се измени колкото е възможно по-малко вида на пред-равновесния разтвор. Разтворът се анализира.

С цел да се проверят доказателствата в аналитичния метод и матричните ефекти, причинени от почвата, трябва да се включи изпитване на празен ход, съдържащо системата почва + CaCl₂ разтвор (без тестваното вещество).

Аналитичните методи, които могат да се използват за измерване на разтворимостта, включва газова-течна хроматография (GLC), високоефективна течна хроматография (HPLC), спектрометрия (т.е. GC/тегло спектрометрия, HPLC/тегло спектрометрия) и броене на течна сцинтилация (за радиоетикетиранни вещества). Независимо от използвания аналитичен метод, се счита за подходящо, ако коефициентите на усвояване са между 90 % и 110 % от номиналните стойности. С цел да се позволи определяне и оценка след разделянето, границите на откриваемост на аналитичния метод са поне две степени под номиналната концентрация.

Характеристиките и границите на откриваемост на аналитичния метод, които са на разположение за извършване на проучвания на адсорбцията, играят важна роля при определяне условията на тестване и цялостното извършване на експеримента. Този метод следва основната пътека за извършване на експеримента и осигурява препоръки и ръководство при избор на алтернативни разтвори, където аналитичният метод и лабораторните съоръжения могат да поставят ограничения.

▼В

1.8.2. Избор на оптимално отношение почва/разтвор

Изборът на подходящо съотношение почва към разтвор за извършване на проучване на разтворимостта, зависи от коефициента на разпространение K_d и съответната степен желана адсорбция. Изменението на концентрацията на веществото в разтвора определя статистическата точност на измерването, което се основава на образуването на адсорбционното уравнение и границите на аналитичната методология, определяйки концентрацията на химикала в разтвора. Следователно е полезно общата практика да се установи върху малки фиксирани съотношения, за които процентът на адсорбция е над 20 % и за предпочитане е > 50 % (62), докато се полагат грижи, за да се запази концентрацията на тестваното вещество във водната фаза, достатъчно висока, за да се измери точно. Това е особено важно в случаи на високи проценти адсорбция.

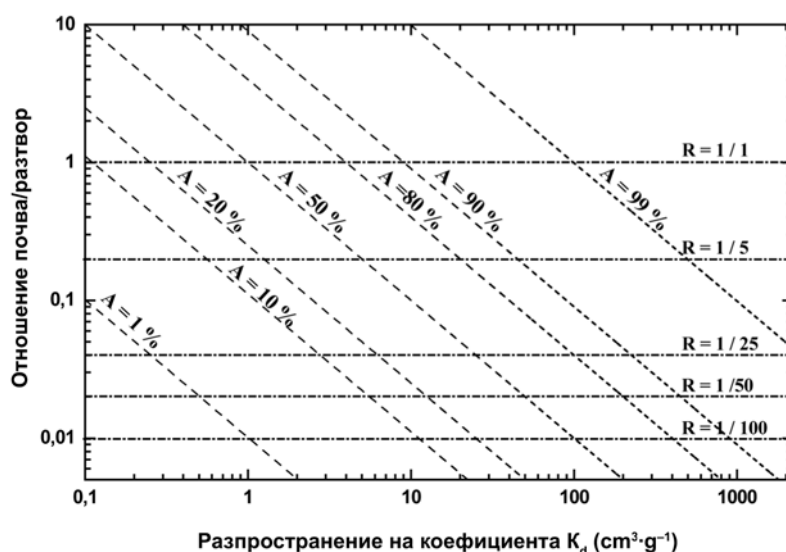
Правилният подход за избор на подходящо съотношение почва/вода се основава на изчисляването на стойността на K_d или чрез първоначално проучване или чрез създаване техника на изчисляването (приложение 3). След това може да се направи избор на подходящо отношение, което се основава на схемата на съотношението почва/разтвор противоположно на K_d за определения процент на адсорбция (фигура 1). На тази схема е изчислено, че уравнението на адсорбция е линейно⁽¹⁾. Отношенията, които се прилагат се постигат чрез предварително постигнато уравнение (4) на K_d във формата на уравнение(1):

$$\frac{V_0}{m_{\text{poda}}} = \left(\frac{m_0}{m_p^{\text{ads}}(\text{eq})} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

или в неговата логаритмична форма, изчисляваща,

$$\text{че } R = m_{\text{пръст}}/V_0 \text{ и } \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0}$$

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{A_{\text{eq}}\%/100}{1 - A_{\text{eq}}\%/100} \right] \quad (2)$$



Фигура 1 Отношения между съотношението почва/разтвор и K_d при различните проценти на адсорбирано тествано вещество

⁽¹⁾ $C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = K_d \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$.

▼B

Фигура 1 показва съотношенията почва/разтвор, които се изискват като функция на K_d за различните нива на адсорбция. Например при отношение почва/разтвор 1:5 и K_d равно на 20, получава се приблизително 80 %. За да се постигнат 50 % адсорбция за същото K_d , трябва да се използва отношение 1:25. Този подход за избиране на подходящото съотношение почва/разтвор дава на изследователите гъвкавост при посрещане нуждите на експеримента.

По-трудните области са тези, където химикалите са високо или много слабо адсорбирани. Където има ниска адсорбция, се препоръчва съотношение 1:1, въпреки че за някои видове органични соли по-малкото съотношение може да е необходимо за получаване на смеси. Трябва да се полагат грижи с аналитичната методика, за да се измерят малките изменения в концентрацията на разтвора; иначе измерването на адсорбцията ще е неточно. От друга страна при много високи коефициенти на разпространение K_d , единият може се увеличи при отношение почва/разтвор 1:100 с цел да се остави значително количество от химикала в разтвора. Обаче трябва да се полагат грижи за да се гарантира доброто смесване и адекватното време трябва да е позволено от системата за уравнивяване. Алтернативен подход при тези изключения, когато аналитичната методология липса, е да се предвиди стойността на K_d , основана на приложимите техники за оценка, например P_{ow} стойности (приложение 3). Това ще е полезно особено за химикали с ниско адсорбни/полярни химикали с $P_{ow} < 20$ и за липофилни/високо сорбни химикали с $P_{ow} > 10^4$.

1.9. ИЗВЪРШВАНЕ НА ТЕСТА

1.9.1. Условия на извършване на теста

Всички експерименти са правят при температура на околната среда и, ако е възможно, при постоянна температура между 20 °C и 25 °C.

Условията на центрофугиране позволяват премахването от разтвора на частици по-големи от 0,2 μm . Тези стойности пускат частиците с най-малък размер, които се считат за твърди частици и това е ограничението между твърдите и колоидните частици. Насоки как да се определят условията на центрофугиране са дадени в приложение 4.

Ако съоръженията за центрофуга не могат да гарантират отстраняването на частици по-големи от 0,2 μm , може да се използва комбинация от центрофуга и филтрация. Тези филтри следва да са направени от подходящ инертен материал, за да се избегнат всякакви загуби на тестваното вещество. При всички случаи трябва да се докаже, че няма никакви загуби от тестваното вещество по време на филтрацията.

1.9.2. Фаза 1 — Първоначално проучване

Целта на извършването на първоначално проучване беше вече дадена в раздела „Обхват“. Ръководство за регулирането на такъв тест е дадено в дадените по-долу предложения.

1.9.2.1. Избор на оптимално съотношение почва/разтвор

Използват се два вида почви и три съотношения почва/разтвор (шест експеримента). Единият вид почва има високо съдържание на органичен въглерод и ниско съдържание на глина, а другият има ниско съдържание на органичен въглерод и високо съдържание на глина. Използват се следните отношения почва/разтвор:

— 50 g почва и 50 cm^3 воден разтвор на тестваното вещество (съотношение 1:1);

▼B

- 10 g почва и 50 cm³ воден разтвор на тестваното вещество (съотношение 1:5);
- 2 g почва и 50 cm³ воден разтвор на тестваното вещество (съотношение 1:25).

Минималното количество почва, с което може да се извърши експеримента зависи от лабораторните съоръжения и изпълнението на използвания аналитичен метод. Въпреки това се препоръчва да се използва поне 1 g и за предпочитане 2 g с цел да се постигнат надеждни резултати от теста.

С цел да се провери устойчивостта на тестваното вещество в CaCl₂ разтвор и неговата възможна адсорбция върху повърхността на съдовете за тестване, една контролна проба само с тестваното вещество при разтвор 0,01 M CaCl₂ (без почва) е насочена към точно същите стъпки от системата, използвана при теста.

Изпитването на празен ход със същото количество почва и обща маса от 50 cm³ на 0,01 M CaCl₂ (без тестваното вещество) е обект на същата процедура. То служи като основен контрол по време на анализа, за да се определят интерфериращите вещества и замърсените почви.

Всички експерименти, включително контролните и на празен ход, се извършват поне два пъти. Общият брой проби, които се приготвят за проучването, може да се изчислят по отношение на методологията, която ще се следва.

Методите за първоначалните проучвания и основното проучване са основно еднакви, изключенията са споменати, където се отнасят.

Пробите почва, изсушени на въздух се уравновесяват чрез разбъркване с минимум обем от 45 cm³ на 0,01 M CaCl₂ през цялата нощ (12 часа) преди деня на експеримента. След това се прибавя определено количество от основния разтвор с цел да се приспособи крайния обем към 50 cm³. Това добавено количество основен разтвор: а) не надвишава 10 % от крайното количество от 50 cm³ на водната фаза с цел да се измени колкото е възможно по-малко природата на разтвора преди равновесие; и б) за предпочитане завършва с първоначална концентрация на тестваното вещество, което е в контакт с почвата (C₀) поне две степени по-високо от границите на откриваемост на аналитичния метод; тези прагове запазват възможността да се извършват точни изчисления дори когато има силна адсорбция (> 90 %) и по-късно да се определят адсорбните изотерми. Също се препоръчва, ако е възможно, първоначалната концентрация на веществото (C₀) да не надвишава половината от неговата граница на разтворимост.

По-долу е даден пример за това как да се изчислява концентрацията на основния разтвор (C_в). Приема се че границата на откриваемост е 0,01 µg cm⁻³ и има 90 % адсорбция; така първоначалната концентрация на тестваното вещество в контакт с почвата за предпочитане е 1 µg cm⁻³ (две степени по-високо от границата на откриваемост). Като се предположи, че се прибавя препоръчаното максимално количество основен разтвор, т.е. от 5 до 45 cm³ на 0,01 M CaCl₂ равновесен разтвор (= 10 % от основния разтвор на 50 cm³ обща маса на водната фаза), концентрацията на основния разтвор е 10 µg cm⁻³; това са трите степени по-високо от границата на откриваемост на аналитичния метод.

pH на водната фаза се измерва преди и след контакта с почвата, тъй като играе важна роля в целия процес на адсорбция и по специално за веществата, които се йонизират.

▼B

Сместа се разбърква, докато не се постигне адсорбционно равновесие. Времето на равновесие в почвата е по-високо променливо в зависимост от химикала и почвата; период от 24 часа обикновено е достатъчен (77). В предварителното проучване може да се събират проби, резултат от 48-часов период на смесване (например на 4, 8, 24, 48 часа). Обаче трябва да се вземе предвид времето на анализа, заедно с гъвкавостта по отношение на работния график на лабораторията.

Има два варианта за анализ на тестваното вещество във воден разтвор: а) паралелен метод и б) сериен метод. Следва да се наблегне на това, че въпреки паралелния метод изисква много повече време, математическата обработка на резултатите е много по-лесна (приложение 5). Обаче изборът на методологията, която трябва да се следва е оставен на тези, които извършват експеримента и които имат нужда да разгледат наличната лабораторна техника и ресурси.

а) паралелен метод: приготвят се проби в съотношение почва/разтвор, с такова количество, каквото е нужно за изследване на адсорбните кинетика през отделните интервали от време. След центрофугата и ако се налага филтрацията, водната фаза на първата тръба се възстановява колкото е възможно повече и след това се измерва, например след 4 часа, втората тръба след 8 часа, третата тръба след 24 и т.н.

б) сериен метод: приготвя се само двойна проба за всяко съотношение почва/разтвор. При определени интервали от време сместа се центрофугира за да се разделят фазите. Малка аликвотна част от водната фаза незабавно се анализира за тестваното вещество; след това експериментът продължава с оригиналната смес. Ако след центрофугата се прилага филтрация, то лабораторията следва да улесни извършването на филтрация на малката водна аликвотна част. Препоръчва се общата маса на взетата аликвотна част да не надвишава 1 % от общото количество разтвор с цел да не се промени значително отношението почва/разтвор и да се намали масата на разтвореното вещество, подготвено за адсорбция по време на теста.

Процента адсорбция A_t се изчислява за всяко определено време (t_i) на основата на номиналната първоначална концентрация и измерената концентрация за времето на взимане на пробите (t_i), коригирано със стойността при празен ход. Схемата на A_t противоположно на времето (фигура 1, приложение 5) се генерира с цел да се изчисли постигането на равновесно плато⁽¹⁾. K_d стойността при равновесие също се изчислява. Основано на тази K_d стойност, от фигура 1 се избира подходящо съотношение почва/разтвор, така че процентът на адсорбция да достигне над 20 % и за предпочитане > 50 % (61). Всички приложими уравнения и принципи на схемата са дадени в раздела за данни и отчитане в приложение 5.

1.9.2.2. *Определяне на времето на адсорбното равновесие и на количеството адсорбирано вещество по време на равновесие*

Както вече се спомена, схемите на A_t или C_{aq}^{ads} противоположно на времето, разрешава изчисляване на постигането на адсорбно равновесие и количеството адсорбирано тествано вещество по време на равновесие. Фигури 1 и 2 в приложение 5 показват примери за такива схеми. Времето на равновесие е това, което е необходимо на системата, за да достигне плато.

⁽¹⁾ Схемите на концентрацията на тестваното вещество във водната фаза (C_{aq}^{ads}) противоположно на времето също може да се използва за да изчисли постигането на равновесно плато (вж. фигура 2 в приложение 5).

▼B

Ако с определен вид почва не се постигне плато, а се открие стабилно увеличаване, това може да е в резултат от усложнени фактори като биоразлагане или слаба дифузия. Биоразлагането може да се покаже чрез повтаряне на експеримента със стерилизирана проба от почвата. Ако не се постигне плато дори и в този случай, тези, които извършват експеримента трябва да се опитат да открият друго явление, което би могло да бъде включено в тяхното специфично изследване; това може да се направи с подходящо изменение на условията, при които се извършва експериментът (температура, време на разбъркване, съотношение почва/разтвор). Оставено е на преценката, на тези които извършват експеримента да решат дали да продължат процедурата, въпреки възможния неуспех при постигане на равновесие.

1.9.2.3. *Адсорбция върху повърхността на съда за тестване и устойчивост на тестваното вещество*

От анализа на контролните проби може да се извлече информация за адсорбцията на тестваното вещество върху повърхността на съда за тестване, така също и за неговата устойчивост. Ако се наблюдава отклонение по-голямо от стандартната грешка на аналитичния метод, може да се включи и абиотично разграждане и/или адсорбция върху повърхността на съда за тестване. Разграничаването между тези две явления може да се постигне чрез цялостно почистване на стените на съда с познато количество подходящ разтворител и подлагайки почистващия разтвор на анализ за тестваното вещество. Ако не се наблюдава адсорбция на повърхността на съдовете за тестване, то разграждането показва абиотичната нестабилност на тестваното вещество. Ако се открие адсорбция е необходимо да се сменят материалите, от които са направени съдовете за тестване. Обаче данните за адсорбцията върху повърхността на съдовете за тестване, които се получават от този експеримент, не могат директно да се екстраполират към експеримента почва/разтвор. Присъствието на почва ще повлияе върху тази адсорбция.

Допълнителна информация за устойчивостта на тестваното вещество може да се извлече чрез определяне на първоначалния баланс на масата през времето. Това означава, че водната фаза, екстрактите от почвата и стените на съдовете за тестване са равни на влошената и/или изпарена и/или не извлечена маса. С цел да се определи балансът на масата трябва да е постигнато адсорбно равновесие за периода на експеримента.

Балансът на масата се извършва върху двете почви и за съотношението почва/разтвор за почвата, което дава отклонение от 20 % и за предпочитане от > 50 % при равновесие. Когато експеримента за откриване на отношението завърши с анализ на последната проба на водната фаза след 48 часа, фазите се разделят чрез центрофуга и ако се е наложило чрез филтрация. Водната фаза се възстановява колкото е възможно повече и към почвата се прибавя подходящ екстрактен разтворител (коэффициент на екстракция поне 95 %) за да се извлече тестваното вещество. Препоръчват се поне две успешни извличания на веществото. Определя се количеството тествано вещество в почвата и се изчислява балансът на масата (уравнение 10, данни и отчитане). Ако е по-малко от 90 %, се счита, че тестваното вещество не е устойчиво по време на извършване на теста. Обаче проучванията могат да продължат, като се вземе предвид неустойчивостта на тестваното вещество; в този случай се препоръчва да се анализират двете фази при основното изследване.

▼B

1.9.2.4. Фаза 2 — Адсорбна кинетика при една концентрация на тестваното вещество

Използват пет вида почви, избрани от таблица 1. Предимство е измежду тези пет вида почви, ако е подходящо, да се включат няколко или всички, използвани почви по време на предварителното проучване. В този случай фаза 2 не се повтаря за почвите, които са използвани при предварителното проучване.

Времето за достигане на равновесно състояние, съотношението почва/разтвор, теглото на пробата от почва, обемът на водната фаза в контакт с почвата и концентрацията на тестваното вещество в разтвора се избират на основата на резултатите от предварителното проучване. За предпочитане анализът се прави приблизително след 2, 4, 6, 8, (възможно и при 10) и 24 часа от времето на контакт; времето на разбъркване може да се удължи на максимум 48 часа в случаите, когато химикала изисква по-дълго време за постигане на равновесно състояние с оглед на резултатите за намиране на съотношението. Обаче времето за анализ може да се разглежда гъвкаво.

Всеки експеримент (един вид почва и един разтвор) се прави поне два пъти за да стане възможно изчисляването променливостта на резултатите. При всеки експеримент се прави едно пускане на празен ход. Той се състои от почва и 0,01 M CaCl₂ без тестваното вещество и теглото и съответно обема идентични на тези от експеримента. На същата процедура се подлага и контролната проба само с тестваното вещество в 0,01 M CaCl₂ разтвор (без почва), служеща за това да предпази от неочакваното.

Процентът адсорбция се изчислява при определено време A_t и/или интервал от време $A_{\Delta t}$ (в съответствие с нуждата) и се изобразява графично противоположно на времето. Коефициента на разпределение K_d при равновесие, както и коефициента на нормализирана адсорбция на органичен въглерод K_{oc} (за не полярните органични химикали), също си изчисляват.

Резултати от теста за адсорбна кинетика

Стойността на линейния K_d обикновено е точна за да опише поведението при сорбция в почвата (35) (78) и представлява израз на собствената мобилност на химикалите в почвата. Например главно химикали с $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ се считат за качествено мобилни. Подобна класификационна схема на мобилността, основана на K_{oc} стойността се развива чрез Маккол (16). Допълнително съществува схема за класификация на извлечането, основана на отношенията между K_{oc} и DT-50⁽¹⁾ (32) (79).

Също така, в съответствие с проучването на допускането на грешки при анализ (61), стойност под $0,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ не може да се изчисли точно от намаляването при концентрацията във водната фаза, дори когато се прилага най-благоприятното (от гледна точка на точността) съотношение почва/разтвор, т.е. 1:1. В този случай се препоръчва анализ и на двете фази — почва и разтвор.

⁽¹⁾ DT-50: времето за разграждане на 50 % от тестваното вещество.

▼B

С оглед на посочените по-горе бележки, се препоръчва да се продължи изследването на поведението на химикала при адсорбция в почвата и неговата потенциална мобилност, чрез определяне на Фройндлих изотерми на адсорбция за тези системи, за които е възможно точното определяне на K_d с протокол за експеримента, воден според метода на този тест. Точното определяне е възможно, ако стойността, която чрез умножаване на K_d с отношението почва/разтвор ще е $> 0,3$, когато измерванията са основани на намаляване на концентрацията във водната фаза (индиректен метод) или ще е $> 0,1$, когато и двете фази са анализирани (директен метод) (61).

1.9.2.5. Фаза 3 — Изотерми на адсорбция и кинетика/изотерми на десорбция

1.9.2.5.1 Изотерми на адсорбция

Използват се пет концентрации от тестваното вещество, които покриват за предпочитане две степени от скалата; когато се избират тези концентрации, се вземат предвид разтворимостта във вода и концентрациите в резултат на водното равновесие. Същото съотношение почва/разтвор за почвата се запазва по време на проучването. Тестът за адсорбция се извършва както е описано по-долу с една разлика, че водната фаза се анализира само веднъж по време, когато е необходимо да се постигне равновесие, както е определено по-горе във фаза 2. Концентрациите при постигнато равновесие се определят и адсорбираното количество се изчислява от обедняването на тестваното вещество в разтвора или чрез директния метод. Адсорбираната маса за единица маса почва се представя графично като функция на концентрацията при постигнато равновесие на тестваното вещество (вж. данни и отчитане).

Резултати от експеримента за изотерми на адсорбция

Измежду досега предложените математически модели за адсорбция, изотермите на Фройндлих са най-често използваните за да се опишат процесите на адсорбция. По-подробна информация за прилагането и важноста на модела на адсорбция се намира в раздел „Препратки“ (41) (45) (80) (82).

Забележка: Трябва да се отбележи, че сравняването на K_F (коэффициента на адсорбция на Фройндлих) стойността за различните вещества е възможно само ако тези K_F стойности се изразяват в същата единица (83).

1.9.2.5.2. Кинетика на десорбцията

Целта на експеримента е да се открие дали химикалът е реверсивно или неревърсивно адсорбиран върху почвата. Този информация е важна, тъй като процеса на десорбция също играе важна роля за поведението на химикала в почвата. Нещо повече, данните от десорбцията са полезни при компютърното моделиране на стимулирането на извличането и разтворения отток — ако е необходимо изследване на десорбцията, се препоръчва да се извърши описаното по-долу изследване върху същата система, за която е бил възможно точно определяне на K_d при предишния експеримент за кинетика на адсорбцията.

Подобно на проучването на кинетиката на адсорбция има две възможности за действие при проучването на кинетиката на десорбция: а) паралелен метод и б) сериен метод. Изборът на методология, която ще се следва се оставя на тези, които извършват експеримента и ще е нужно да вземат предвид и наличната лабораторна техника и ресурси.

▼ B

- а) Паралелен метод: за всеки вид почва, който е избран за изследването за десорбция се приготвят проби със същото съотношение почва/разтвор, в такова количество каквото е нужно за изследване на десорбната кинетика през отделните интервали от време. За предпочитане се използват същите интервали от време като при експеримента за кинетика на адсорбцията; обаче, с цел системата да достигне равновесие на десорбция, когато е подходящо, може да се увеличи общото време. При всеки експеримент (един вид почва и един разтвор) се извършва пускане на празен ход. Той се състои от почва и 0,01 М CaCl₂ разтвор без тестваното вещество и тегло и съответно обем, идентични на тези от експеримента. Като контролна проба тестваното вещество в разтвор 0,01 М CaCl₂ се подлага на същата процедура на тестване. Всички смеси на почвата с разтвора се разбъркват, докато не се постигне равновесие на адсорбцията (както е определено по-горе във фаза 2). Тогава фазите се разделят чрез центрофуга и, ако е възможно, се отстранява водната фаза. Обемът на отстранения разтвор се замества с равно количество 0,01 М CaCl₂ без тестваното вещество и новата смес се разбърква отново. Водната фаза от първата тръба се възстановява, колкото е възможно и се изчислява след например 2 часа, втората тръба — след 4 часа, третата тръба — след 6 часа и т.н., докато се постигне равновесие на десорбцията.
- б) Сериен метод: след експеримента за кинетика на адсорбцията, сместа се центрофугира и водната фаза се отстранява доколкото е възможно. Обемът на отстранения разтвор се замества с равно количество 0,01 М CaCl₂ без тестваното вещество. Новата смес се разбърква отново докато се получи равновесие на десорбцията. През това време на определени интервали от време сместа се центрофугира за да се разделят фазите. Малка аликвотна част на водната фаза незабавно се анализира за тестваното вещество; след това експеримента продължава с оригиналната смес. Препоръчва се общата маса на взетата аликвотна част да не надвишава 1 % от общото количество. Същото количество пресен разтвор 0,01 М CaCl₂ се прибавя към сместа за да се поддържа отношението почва/разтвор и разбъркването продължава до следващия интервал от време.

Процентът десорбция се изчислява за всяко определено време ((D_t)) и/или за интервал от време ((Δt)) (В съответствие с нуждите на изследването) и се изобразява графично противоположно на времето. Коефициентът на десорбция K_{des} при равновесие също се изчислява. Всички приложими уравнения и принципи на схемата са дадени в раздела за данни и отчитане и приложение 5.

Резултати от експеримента за кинетика на десорбция

Общи схеми на процентите на десорбция D_t и адсорбция A_t противоположно на времето позволяват изчисляването на обратимостта на процеса на адсорбция. Ако равновесието на десорбция се постигне дори при двойно време от постигане равновесието на адсорбция и общата десорбция е повече от 75 % от адсорбираното количество, се счита, че адсорбцията е обратима.

1.9.2.5.3. Изотерми на десорбцията

Изотермите на десорбция на Фройндлих се определят върху почвите, използвани при експериментите за определяне на изотермите на адсорбция. Тестът се извършва, както е описано в раздел кинетика на десорбцията, с единствената разлика, че водната фаза се анализира веднъж при постигната равновесие на десорбция. Количеството десорбирано тествано вещество се изчислява. Съдържанието тествано вещество, останало адсорбирано върху почвата при равновесие на десорбция, се представя графично като функция на концентрацията на постигнато равновесие на тестваното вещество в разтвора (вж. „Данни и отчитане“ и приложение 5).

▼B

2. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

Аналитичните данни се представят в таблична форма (вж. приложение 6). Отделните измервания и изчислените средни стойности се дадени. Графичното представяне на изотермите на адсорбция са доказани. Изчисленията се правят, както е описано по-долу.

За целите на теста се счита, че тегло от 1 cm³ от водния разтвор е 1 g. Съотношението почва/разтвор може да се изразява в единици от w/w или w/vol със същите цифри.

2.1. АДСОРБЦИЯ

Адсорбцията A_{t_i} се определя като процент от адсорбираното вещество върху почвата по отношение на представеното количество в началото на теста, при условията за извършване на теста. Ако тестваното вещество е устойчиво и не се адсорбира значително върху стените на контейнера, A_{t_i} се изчислява при определено време t_i съгласно уравнението:

$$A_{t_i} = \frac{m_p^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (3)$$

където:

A_{t_i} = процентът на адсорбция при определено време t_i (%);

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = масата тествано вещество, адсорбирано върху почвата при време t_i (µg);

m_0 = масата тествано вещество в тръбата при началото на теста (µg).

Подробна информация за това как да се изчислява процента адсорбция A_{t_i} за паралелния и серийния метод е дадена в приложение 5.

Коефициентът на разпределяне K_d е съотношение между съдържанието на вещество във почвата и концентрацията на масата на веществото във водния разтвор, при условията на извършване на теста, когато е постигнато равновесие на адсорбция.

$$K_d = \frac{C_p^{\text{ads}}(\text{eq})}{C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})} = \frac{m_p^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{puda}}} (\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}) \quad (4)$$

където:

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = съдържание на адсорбираното вещество върху почвата при равновесие на адсорбция (µg g⁻¹);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = концентрация на масата на веществото във водна фаза при равновесие на адсорбция (µg g⁻³). Тази концентрация се определя аналитично като се вземат предвид получените по време на пускането на празен ход стойности;

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = маса на веществото адсорбирано върху почвата при равновесие на адсорбция (µg);

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = маса на веществото в разтвора при равновесие на адсорбция (µg);

m_{soil} = количество почва, изразено като суха маса почва (g);

V_0 = първоначален обем на водната фаза в контакт с почвата (cm³).

Отношението между A_{eq} и K_d е дадено чрез:

$$K_d = \frac{A_{\text{eq}}}{100 - A_{\text{eq}}} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{puda}}} (\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}) \quad (5)$$

▼ B

където:

A_{eq} = процентът адсорбция при равновесие на адсорбция %.

Коефициентът на нормализирана адсорбция на органичния въглерод K_{oc} свързва коефициента на разпределение K_d към съдържанието на органичен въглерод на пробата от почва:

$$K_{ou} = K_d \cdot \frac{100}{\%ou} \text{ (cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}\text{)} \quad (6)$$

където:

$\%OC$ = процентът на органичен въглерод в пробата от почва (g g^{-1}).

K_{oc} коефициентът представлява отделна стойност, която характеризира разделянето главно на неполярните химикали между органичния въглерод в почвата или седименти и вода. Адсорбцията на тези химикали се намира в съотношение с органичното съдържание на сорбиращи частици (7); така K_{oc} стойност зависи от специфичните характеристики на влажните частици, които значително се отличават със сорбционна способност заради разликите при произхода, генезиса и т.н.

2.1.1. Изотерми на адсорбция

Уравненията на Фройндлих изотермите на адсорбция на свързват адсорбираното тествано вещество върху почвата с концентрацията тествано вещество в разтвора при равновесие на адсорбция (уравнение 8).

Данните се обработват като при раздела „Адсорбция“ и, за всяка епруветка, се изчислява съдържанието на адсорбирано тествано вещество върху почвата след теста за адсорбция ($C_s^{ads}(eq)$, другаде обозначени като x/m). Приема се, че равновесието е постигнато и че $C_s^{ads}(eq)$ представлява стойността на равновесие:

$$C_p^{ads}(eq) = \frac{m_p^{ads}(eq)}{m_{p\ddot{u}da}} = \frac{[C_0 - C_{vod}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{p\ddot{u}da}} \text{ (}\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} \quad (7)$$

Уравненията на Фройндлих изотермите на адсорбция са показани в:

$$C_p^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{vod}^{ads}(eq)^{1/n} \text{ (}\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} \quad (8)$$

или в линейна форма:

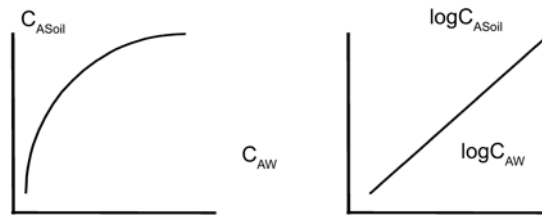
$$\log C_p^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{vod}^{ads}(eq) \quad (9)$$

където:

K_F^{ads} = коефициент на адсорбция на Фройндлих; неговата геометрична характеристика е $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ само ако $1/n = 1$; във всички други случаи наклонената $1/n$ се въвежда в геометричната характеристика на K_F^{ads} ($\mu\text{g}^{-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \cdot \text{g}^{-1}$);

n = константа на регресията; $1/n$ основно между $0,7 - 1,0$, което показва, че данните за сорбцията са често по-скоро нелинейни.

Уравнения (8) и (9) се изобразени в графика и стойностите K_F^{ads} и $1/n$ се изчисляват чрез регресионен анализ, като се използва уравнение 9. Коефициентът на корелация r^2 на логаритмичното уравнение също се изчислява. Пример на такова графично изображение е дадено във фигура 2.

▼ B2.1.2. **Баланс на масата**

Балансът на масата (БМ) се определя като процент вещество, което може да бъде аналитично възстановено след теста за адсорбция противоположно на номиналното количество вещество в началото на теста.

Обработването на данните ще е различно, ако разтворът напълно се смеси с водата. В този случай обработката на данните, описана в „десорбция“ може да се прилага, за да се определи количеството вещество възстановено чрез извличане на разтворителя. Ако разтворителят е по-малко смесим с водата, трябва да се направят изчисления на възстановеното количество.

Балансът на масата (МБ) за адсорбция се изчислява, както следва: приема се, че периодът (m_E) отговаря на сумата от масите на тестваното вещество, извлечено от почвата и повърхността на съда за тестване с органичен разтворител:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{vod}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \quad (10)$$

където:

MB = балансът на масата (%)

m_E = общата маса тестваното вещество, извлечено от почвата и повърхността на съда за тестване в два хода (μg);

C_0 = концентрацията първоначална маса на тестваното вещество в контакт с почвата ($\mu g \text{ cm}^{-3}$);

V_{rec} = обем на плаващите отгоре частици, възстановени след постигнато равновесие на адсорбция (cm^3).

2.2. **ДЕСОРБЦИЯ**

Десорбцията (Д) се определя като процент тествано вещество, което е десорбирано, отнасящо се към количеството вещество предварително адсорбирано при условията на извършване на теста:

$$D_{t_i} = \frac{m_{vod}^{des}(t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (11)$$

където:

D_{t_i} = процент десорбция при определено време t_i (%);

▼ B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = маса на десорбирано вещество от почвата при определено време t_i (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = маса на веществото, адсорбирано върху почвата при равновесие на адсорбция (μg).

Подробна информация за това как да се изчислява процентска десорбция D_i за паралелния и серийния метод е дадена в приложение 5.

Коефициентът на очевидната десорбция K_{des} е, при условията за извършване на теста, съотношение между съдържанието на вещество оставащо в почвата и концентрацията на масата на десорбираното вещество във водния разтвор, когато е постигнато равновесие на десорбция:

$$K_{des} = \frac{m_p^{ads}(eq) - m_{vod}^{des}(eq) \cdot V_T}{m_{vod}^{des}(eq) \cdot m_{p\ddot{u}da}} \quad (\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}) \quad (12)$$

където:

K_{des} = коефициент на десорбция ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = маса на десорбирано от почвата при равновесие на десорбция (μg);

V_T = общ обем на водната фаза в контакт с почвата по време на изпитване кинетиката на десорбция (cm^3).

Ръководство за изчисляване на $m_{aq}^{des}(eq)$ е дадено в допълнение 5 в раздел „Десорбция“.

Забележка:

Ако изпитването на адсорбцията, което е предшествовало, е било извършено с паралелен метод, се счита, че V_T в уравнение 12 е равно на V_0 .

2.2.1. Изотерми на десорбция

Уравненията на Фройндлих за изотермите на десорбция свързват съдържанието на тестваното вещество, адсорбирано върху почвата с концентрацията тествано вещество в разтвора при равновесие на десорбция (уравнение 16).

За всяка епруветка съдържанието на тестваното вещество адсорбирано върху почвата при равновесие на десорбция се изчислява, както следва:

$$C_p^{des}(eq) = \frac{m_p^{ads}(eq) - m_{vod}^{des}(eq)}{m_{p\ddot{u}da}} \quad (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ се определя като

$$m_{vod}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_F} - m_{vod}^A(\mu\text{g}) \quad (14)$$

където:

$C_s^{ads}(eq)$ = съдържание на адсорбираното вещество върху почвата при равновесие на десорбция ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$);

$m_m^{ads}(eq)$ = масата вещество определено аналитично във водната фаза при равновесие на десорбция (μg);

▼B

m_{aq}^{A} = масата тествано вещество останало от равновесието на адсорбция заради непълно количествено заместване (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = масата вещество в разтвора при равновесие на адсорбция (μg);

$$m_{\text{vod}}^{\text{A}} = m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_{\text{R}}}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_{F}^{F} = обем на количеството разтвор, взето от епруветката за измерване на тестваното вещество при равновесие на десорбция (cm^3);

V_{R} = количеството плаващи частици, отстранени от епруветката след постигане на равновесие на адсорбция и са заместени със същия обем от 0,01 M CaCl_2 (cm^3).

Уравненията на Фройндлих за изотермите на адсорбция са показани в 16:

$$C_{\text{p}}^{\text{des}}(\text{eq}) = K_{\text{F}}^{\text{des}} \cdot C_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})^{1/n} (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (16)$$

или в линейна форма

$$\log C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq}) = \log K_{\text{F}}^{\text{des}} + 1/n \cdot \log C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) \quad (17)$$

където:

$C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = коефициент на десорбция на Фройндлих;

n = константа на регресията;

$C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = концентрация на масата на веществото във водна фаза при равновесие на десорбция ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-3}$).

Уравнения 16 и 17 са изобразени графично и стойностите $K_{\text{F}}^{\text{des}}$ и $1/n$ се изчисляват чрез регресионен анализ, използвайки уравнение 17.

Забележка:

Ако Фройндлих показатели за адсорбция и десорбция $1/n$ са равни на 1, Фройндлих закрепващи константи за адсорбция и десорбция ($K_{\text{F}}^{\text{ads}}$ и $K_{\text{F}}^{\text{des}}$) ще бъдат равни съответно на константите на равновесие на адсорбция и десорбция (K_{d} и K_{des}) и графичното изображение на C_{s} vs C_{aq} ще е линейно. Ако показателите не са равни на 1, то графичното изображение C_{s} vs C_{aq} няма да бъде линейно и константите за адсорбция и десорбция ще варират през изотермите.

2.2.2. Отчитане на теста

Отчитането на теста включва следната информация:

- пълна идентификация на използваните проби от почва включва:
- географско положение на площадката, от където са взети (географска ширина и дължина);
- дата на взимането на пробите;

▼B

- използвани образци (т.е. земеделски почви, гори и т.н.);
- дълбочина на взимането на пробите;
- съдържание на пясък, утайка, глина;
- стойности на рН (в 0,01 М CaCl₂);
- съдържание на органичен въглерод;
- съдържание на органични частици;
- съдържание на амоняк,
- отношение C/N;
- капацитет на обмяната на катиони (mmol/kg);
- всякаква информация, която се отнася до събирането и съхраняването на пробите от почви;
- където е уместно, всякаква информация за тълкуването на адсорбцията/десорбцията на тестваното вещество;
- указания за методите, използвани при определяне на всеки параметър;
- информация за тестваното вещество, ако е уместно;
- температура на експеримента;
- условия на центрофугиране;
- аналитична процедура, използвана за анализ на тестваното вещество;
- оправдаване използването на разтварящ фактор за подготовка на основния разтвор на тестваното вещество;
- обяснения за направени поправки при изчисленията, ако са релевантни;
- данни съгласно формуляра (приложение 6) и графично представяне;
- цялата информация и полезни наблюдения за тълкуване на резултатите от теста.

3. **ПРЕПРАТКИ**

- (1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045. Part II.
- (2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987) Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045. Part I.
- (3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
- (4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18—20 January 1995 (June 1995).
- (5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

- (6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
- (7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
- (8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
- (9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
- (11) BB A (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
- (12) Calvet R., (1989), „Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils“, in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
- (13) Calvet R., (1980), „Adsorption-Desorption Phenomena“ in Interactions between herbicides and the soil. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83—122.
- (14) Hasset J. J., and Banwart W.L., (1989), „The sorption of nonpolar organics by soils and sediments“ in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31—44.
- (15) van Genuchten M. Th., Davidson J. M., and Wierenga P. J., (1974), „An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media“. Soil Sci. Soc. Am. Proa, Vol. 38(1), pp. 29—35.
- (16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L., and Dishburger H. J., (1981), „Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis“, in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.
- (17) Lambert S. M., Porter P. E., and Schieferrstein R. H., (1965), „Movement and sorption of chemicals applied to the soil“. Weeds, 13, pp. 185—190.
- (18) Rhodes R. C., Belasco I. J., and Pease H. L., (1970) „Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils“. J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524—528.
- (19) Russell M. H., (1995), „Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil“ in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.
- (20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W. and Holland P. T., (1988), „Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides“, IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901—932.

▼B

- (21) Guth J. A., Burkhard N., and D. O. Eberle, (1976), „Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils“. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137—157, BCPC, Surrey, UK.
- (22) Furminge C. G. L., and Osgerby J. M., (1967), „Persistence of herbicides in soil“. J. Sci. Fd Agric, 18, pp. 269—273.
- (23) Burkhard N., and Guth J. A., (1981), „Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption“. Pestic. Sci. 12, pp. 45—52.
- (24) Guth J. A., Gerber H. R., and Schlaepfer T., (1977), „Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides“. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961—971.
- (25) Osgerby J. M., (1973), „Process affecting herbicide action in soil“. Pestic. Sci., 4, pp. 247—258.
- (26) Guth J. A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden“. Schr. Reihe Ver. Wass.-Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143—154.
- (27) Hamaker J. W., (1975), „The interpretation of soil leaching experiments“, in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. Freed), pp. 135—172, Plenum Press, NY.
- (28) Helling C. S., (1971), „Pesticide mobility in soils“. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 35, pp. 732—210.
- (29) Hamaker J. W., (1972), „Diffusion and volatilization“ in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I, pp. 49—143.
- (30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system“. Pestic. Sci. 12, pp. 37—44.
- (31) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297—325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
- (32) Gustafson D. I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability“. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339—357.
- (33) Leistra M., and Dekkers W. A., (1976). „Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils“. J. of Soil Sci., 28, pp. 340—350.
- (34) Bromilov R. H., and Leistra M., (1980), „Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils“. Pest. Sci., 11, pp. 389—395.
- (35) Green R. E., and Karickhoff S. W., (1990), „Sorption estimates for modeling“, in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80—101,
- (36) Lambert S. M., (1967), „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure“. J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572—576.

▼B

- (37) Hance R. J., (1969), „An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils“. *J. Agri. Food Chem.*, 17, pp. 667—668.
- (38) Briggs G. G. (1969), „Molecular structure of herbicides and their sorption by soils“. *Nature*, 223, 1288.
- (39) Briggs G. G. (1981). „Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor“. *J. Agric. Food Chem.*, 29, pp. 1050—1059.
- (40) Sabljic A., (1984), „Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology“. *J. Agric. Food Chem.*, 32, pp. 243—246.
- (41) Bailey G. W., and White J. L., (1970), „Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil“. *Residue Rev.*, 32, pp. 29—92.
- (42) Bailey G. W., J. L. White and Y. Rothberg., (1968), „Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate“. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 32: pp. 222—234.
- (43) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. *Chemosphere* 10, pp. 833—846.
- (44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), „Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners“. *Environ. Toxicol. Safety* 21, pp. 1—17.
- (45) Hamaker J. W., and Thompson J. M., (1972), „Adsorption in organic chemicals“ in *Organic Chemicals in the Soil Environment* (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49—143.
- (46) Deli J., and Warren G. F., 1971, „Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils“. *Weed Sci.* 19: pp. 67—69.
- (47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J. M. and Santelmann, (1975), „Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils“. *Weed Science*, Vol. 23, pp. 454—57.
- (48) Haues M. H. B., Stacey M., and Thompson J. M., (1968), „Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations“ in *Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies*, p.75, International Atomic Energy Agency, Vienna.
- (49) Pionke H. B., and Deangelis R. J., (1980), „Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase“, CREAMS, in *A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems*, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.
- (50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).
- (51) Scheffer F., and Schachtschabel, *Lehrbuch der Bodenkunde*, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.
- (52) Black, Evans D. D., White J. L., Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. „Methods of Soil Analysis“, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼ B

- (53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
- (54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.
- (55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.
- (56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
- (57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
- (58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), „Precision in pesticide adsorption measurements“. *Soil Sci. Am. Proa*, 34, pp. 353—354.
- (60) Grover R., and Hance R. J. (1970), „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine“. *Soil Sci.*, pp. 109—138.
- (61) Boesten, J. J. T. I., „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system“. *Pest. Sci.* 1990, 30, pp. 31—41.
- (62) Boesten, J. J. T. I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106“. *Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects*, Brussels, 26—29 April 1994.
- (63) Bastide J., Cantier J. M., et Coste C., (1980), „Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique“. *Weed Res.* 21, pp. 227—231.
- (64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments“. *J. Environ.Qual.*, 10(3), pp. 382—386.
- (65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), „Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water“. *Environ. Sci. Technol*, 17(4), pp. 227—231.
- (66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments“. *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), pp. 297—312.
- (67) Vowles P. D., and Mantoura R. F. C., (1987), „Sediment-water partition coefficient and CLIP retention factors of aromatic hydrocarbons“. *Chemosphere*, 16(1), pp. 109—116.
- (68) Lyman W. J., Reehl W. F. and Rosenblatt D. H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds*. American Chemical Society, Washington DC.
- (69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I. (1980). „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota“ in *Aquatic Toxicology* (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78—115, ASTM STP 707, Philadelphia.

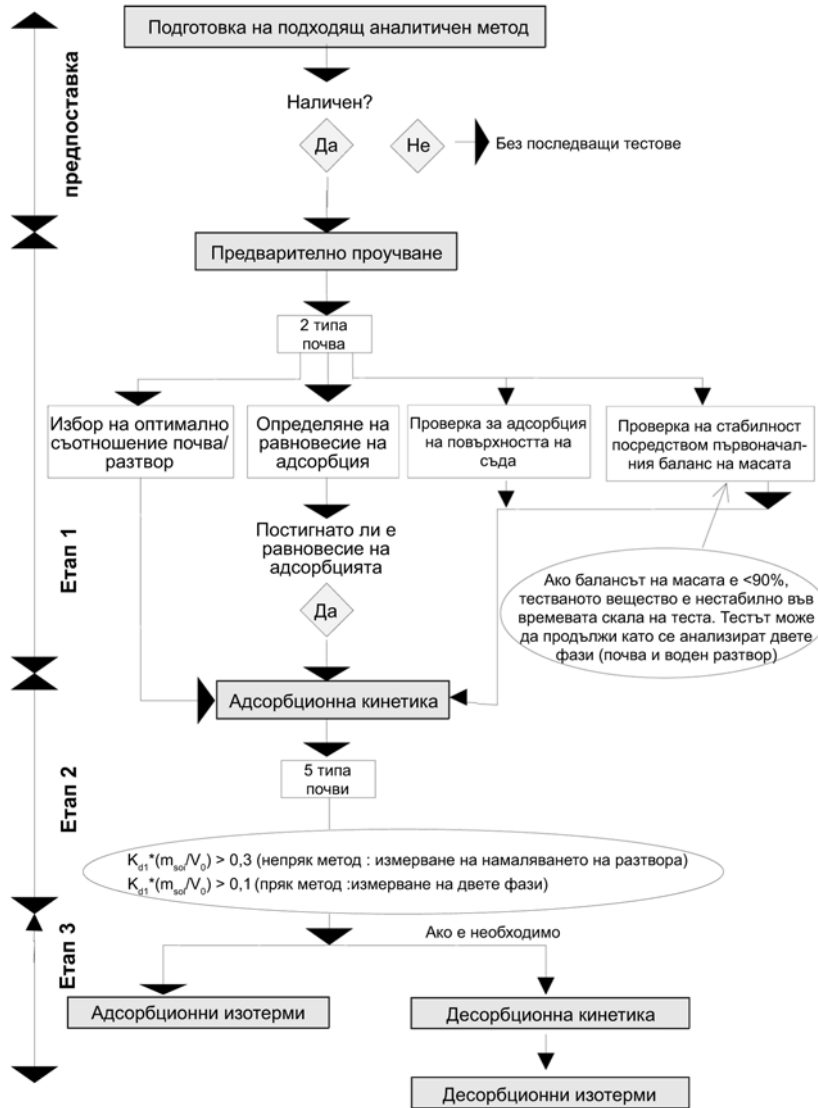
▼B

- (70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds“. *Science*, Vol. 206, pp. 831—832.
- (71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G., and Means J. C., (1981), „Sorption of *N*-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption“. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, pp. 38—42.
- (72) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. *Chemosphere*, Vol. 10(8), pp. 833—846.
- (73) Moreale A., van Bladel R., (1981), „Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité“. *Revue de l'Agric.*, 34 (4), pp. 319—322.
- (74) Müller M., Kördel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil“. *Chemosphere*, 32(12), pp. 2493—2504.
- (75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), „HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test“. *Chemosphere* 30 (7), pp. 1373—1384.
- (76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), „HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases“> *Chemosphere* 27 (12), pp. 2341—2352.
- (77) Hance, R. J., (1967), „The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides“. *Weed Research*, Vol. 7, pp. 29—36.
- (78) Koskinen W. C. and Harper S. S., (1990), „The retention processes: mechanisms“ in *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.
- (79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G. (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp. 297—325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
- (80) Giles C. H., (1970), „Interpretation and use of sorption isotherms“ in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14—32.
- (81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D., (1960), „Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils“. *J. Chem. Soc.*, pp. 3973—93.
- (82) Calvet R., Terce M., and Arvien J. C. (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption“. *Ann. Agron.* 31: pp. 239—251.
- (83) Bedbur E., (1996), „Anomalies in the Freundlich equation“, *Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment*, 13—15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.
- (84) Guth, J. A., (1985), „Adsorption/desorption“, in *Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1—3, Canterbury, UK.
- (85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).

▼B

Приложение 1

Схема на тестабае





Приложение 2

ВЪЗДЕЙСТВИЕ НА ТОЧНОСТТА НА АНАЛИТИЧНИЯ МЕТОД И ИЗМЕНЕНИЕТО ВЪРХУ ТОЧНОСТТА НА АДСОРБНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

От следващата таблица (84) става ясно, че когато разликата между първоначалната маса ($m_{aq}^{ads}(eq) = 110 \mu g$) и маса на равновесието ($m_s^{ads}(eq) = 100 \mu g$) от тестваното вещество в разтвора е много малка, грешка от 5 % в изчисляването на концентрацията на равновесие ще доведе до грешка от 50 % при изчисляване на масата на веществото, адсорбирано в почвата ($m_s^{ads}(eq)$) и 52,4 % в изчисляването на K_d .

Количество почва $m_{soil} = 10 g$
Обем на разтвора $v_0 = 100 cm^3$

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (μg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ ($\mu g cm^{-3}$)	R	$m_s^{ads}(eq)^*$ (μg)	$C_s^{ads}(eq)^*$ ($\mu g g^{-1}$)	R^{\ddagger}	K_d^*	R^{\ddagger}
3 A A = 9 %								
$\tau_0 = 100 \mu g$ или $C_0 = 1.100 \mu g cm^{-3}$	100	1,000	Действи телна стойност	10	1,00	Действи телна стойност	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
3A A = 55 %								
$\tau_0 = 100 \mu g$ или $C_0 = 1.100 \mu g cm^{-3}$	50,0	0,500	Действи телна стойност	60,0	6,00	Действи телна стойност	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
3A A = 99 %								
$\tau_0 = 100 \mu g$ или $C_0 = 1.100 \mu g cm^{-3}$	1,100	0,011	Действи телна стойност	108,9	10,89	Действи телна стойност	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

където:

* $m_s^{ads}(eq)$ = следва формула

$m_s^{ads}(eq)$ = маса на тестваното вещество в почвата при равновесие μg

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = маса на тестваното вещество във водната фаза при равновесие μg

$C_s^{ads}(eq)$ = съдържанието на тестваното вещество в почвата при равновесие $\mu g g^{-1}$

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = съдържанието на тестваното вещество във водната фаза при равновесие $\mu g cm^{-3}$

R = аналитична грешка при определяне на $m_{aq}^{ads}(eq)$

R_+ = грешка, получена заради аналитичната грешка R.



Приложение 3

ТЕХНИКА НА ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА K_D

1. Техниките на изчисляване позволяват предвиждане на K_D , основана на корелацията с например P_{ow} стойности (12) (39) (63-68), данни за разтворимост във вода (12) (19) (21) (39) (68-73) или данни за полярността, получени от HPLC при противоположната фаза (74-76). Както е показано в таблици 1 и 2, K_{oc} и K_{om} се изчисляват чрез тези уравнения и след това индиректно K_d :

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} (\text{cm}^3 \text{g}^{-1})$$

2. Принципът на тези корелации се основава на две предположения: 1. органичното вещество е това, което основно въздейства върху адсорбцията на веществото и 2. включените взаимодействия са главно неполярни. Като резултат тези корелации: 1. не са или са само в определена степен приложими за полярните вещества и 2. не се прилагат в случаите, когато съдържанието на органични частици на почвата е много малко (12). Като допълнение, въпреки че се намират задоволителни корелации между P_{ow} и адсорбцията (19), същото не може да се каже за отношенията между водната разтворимост и степента на адсорбция (19) (21); засега проучванията са много противоречиви.
3. Някои примери на корелации между разпространяването на адсорбция и коефициент на разделяне на коефициент на октанола, разтворим във вода, както и разтворимост във вода са дадени в таблици 1 и 2, съответно.

Таблица 1

Примери на корелации между коефициента на разпространяване на адсорбция и коефициент на октанола, разтворим във вода; за повече примери (12) (68)

Вещества	Корелации	Автори
Заместена урея	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Ароматично хлорирана	$\log K_{oc} = -0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou и al. (1983) (65)
Различни пестициди	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl и Mingelgrin (1984) (66)
Ароматни въглеводороди	$\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles и Mantoura (1987) (67)

Таблица 2

Примери за корелации между коефициента на разпространяване на адсорбция и разтворимостта във вода; за повече примери (68) (69)

Съединения	Корелации	Автори
Различни пестициди	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl и Mingelgrin (1984) (66)
Алифатни, ароматично хлорирани вещества	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$	Chiou и al. (1979) (70)
α -нафтол	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Циклични, алифатни ароматични вещества	$\log K_{oc} = -1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 (\text{mp}-25)$	Karickhoff (1981) (72)
Различни съединения	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)



Приложение 4

**ИЗЧИСЛЕНИЯ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА УСЛОВИЯТА, ПРИ КОИТО
СЕ ИЗВЪРШВА ЦЕНТРОФУГА**

1. Времето за центрофуга е дадено чрез следната формула, вземайки за дадено

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

За рационалните цели всички параметри са описани в не-SI единици (g, cm).

Където:

ω = скоростта на ротация (= 2 π грм/60), rad s⁻¹;

грм = обороти на минута;

η = вискозитет на разтвора, g s⁻¹ cm⁻¹;

r_p = радиус на частицата, cm;

ρ_s = плътност на почвата, g cm⁻³;

ρ_{aq} = плътност на разтвора, g cm⁻³;

R_t = разстоянието от центъра на ротора на центрофугата до повърхността на разтвора в тръбата за центрофуга, cm;

R_b = разстоянието от центъра на ротора на центрофугата до дъното на разтвора в тръбата за центрофуга, cm;

$R_b - R_t$ = дължината на сместа почва/разтвор в тръбата за центрофуга, cm.

В общата практика се удвоява времето за изчисляване, за да се гарантира пълното разделяне.

2. Уравнение 1 може да се опрости по-нататък, ако се приеме, че вискозитета (η) и плътността ρ_{aq} на разтвора са равни на вискозитета и плътността на водата при 25 °C; така $\eta = 8,95 \times 10^{-3}$ g⁻¹ cm⁻¹ и $\rho_{aq} = 1,0$ g cm⁻³.

След това времето за центрофуга е дадено в уравнение (2):

$$t = \frac{3,7}{(\text{грм})^2 \cdot r_p^2 (\rho_p - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

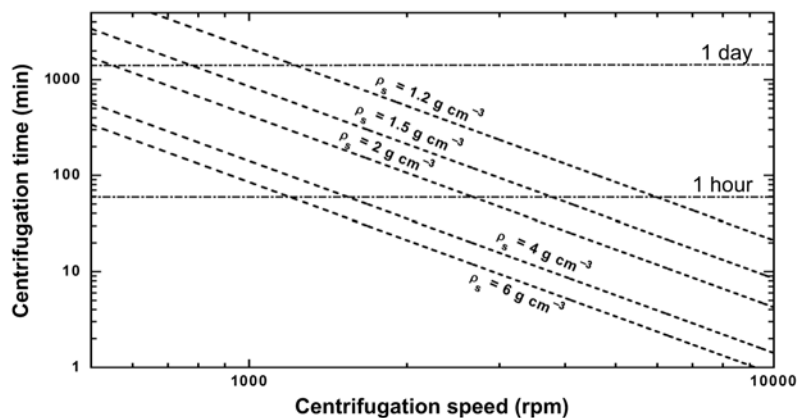
3. От уравнение 2 става ясно, че двата параметъра са важни при определянето на условията, при които трябва да се извърши центрофугата, т.е. времето (t) и скоростта (грм), за да се постигне разделяне на частиците с определен размер (в нашия случай 0,1 μ m радиус): 1. плътността на почвата и 2. дължината на сместа в тръбата за центрофуга ($R_b - R_t$), т.е. разстоянието, което частиците почва покриват от повърхността на разтвора до дъното на тръбата; очевидно определен обем дължина на сместа в тръбата ще зависи от радиуса на тръбата, повдигнат на втора степен.
4. Фигура 1 представя променливостта във времето на центрофугиране (t) спрямо скоростта на центрофугиране (грм) за различната плътност на почвите (ρ_s) (фигура 1a) и различните дължини на сместа в тръбите за центрофуга (фигура 1a). От фигура 1a се вижда въздействието на плътността на почвата; например за класическата центрофуга с 3 000 грм, времето за центрофуга е приблизително 240 min за 1,2 g cm⁻³ плътност на почвата, докато само 50 min за 2,0 g cm⁻³. По подобен начин от фигура 1b за класическата центрофуга с 3 000 грм, времето за центрофуга е приблизително 50 min при дължина на сместа от 10 cm и само 7 min при дължина от 1cm. Обаче е важно да се намери и оптималното отношение между центрофугата, което изисква възможно по-малка дължина и лесно боравене за тези, които извършват теста при разделянето на фазите след центрофугата.

▼В

5. Нещо повече, когато се определят условията за извършване на експеримента за разделяне на фазите почва/разтвор, е важно да се разгледа възможното съществуване на трета „псевдофаза“ колоиди. Тези частици с големина по-малка от $0,2 \mu\text{m}$ могат да окажат важно въздействие върху целия механизъм на адсорбция на веществото в почвена суспензия. Когато центрофугата се извършва, както е описано по-горе, колоидите остават във водната фаза и се подлагат на анализ заедно с водната фаза. Така се губи информация за тяхното въздействие.

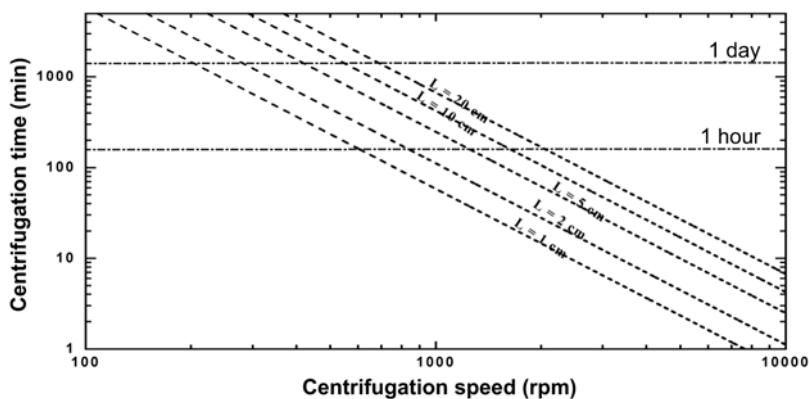
Ако извършващата лаборатория има техника за ултрацентрофуга или ултрафилтрация, адсорбцията/десорбция на веществото в почвата може да се изследва в по-голяма дълбочина, включително информация за адсорбцията на веществото върху колоидите. В този случай, за да се разделят трите фази почва, колоиди и разтвор, се използва апаратура за ултрацентрофуга от $60\,000 \text{ rpm/min}$ или ултрафилтрация с пропускливост на филтъра от $100\,000$ далтона. Протоколът, който се води по време на теста, също съответно се изменя с цел всичките три фази да се подложат на анализ на веществата.

Фигура 1а



Променливост на времето за центрофуга (t) противоположно на скоростта на центрофуга (rpm) за различната плътност на почвите (ρ_s). $R_t = 10 \text{ cm}$, $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ и $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ при $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Фигура 1б



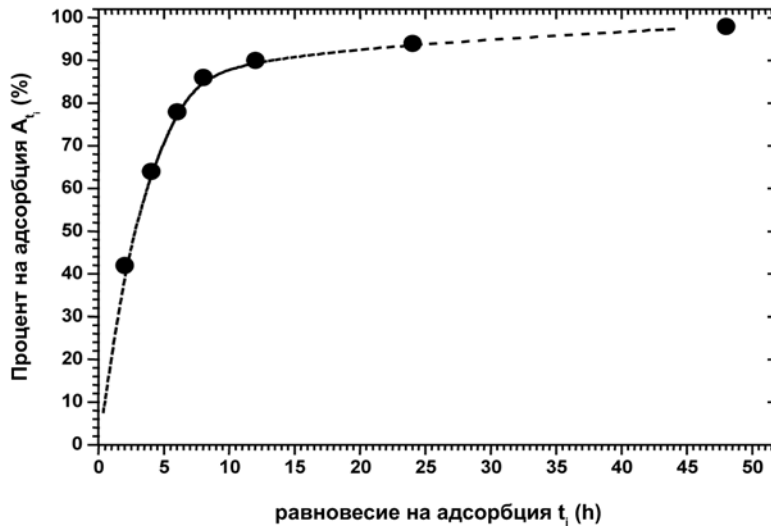
Променливост на времето за центрофуга (t) противоположно на скоростта на центрофуга (rpm) за различната дължина на сместа в тръбата за центрофуга ($R_b - R_t$) = L ; $R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ при $25 \text{ }^\circ\text{C}$ и $\rho_s = 2,0 \text{ g cm}^{-3}$.

▼В

Приложение 5

ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА АДСОРБЦИЯТА А (%) И ДЕСОРБЦИЯ D (%)

Графиката на времето за извършване на процедурата е:



За всички изчисления се приема, че тестваното вещество е устойчиво и не се адсорбира значително върху стените на контейнера.

АДСОРБЦИЯ А (А %)

а) *Паралелен метод*

Процентът адсорбция се изчислява за всяка използвана епруветка (i) за определено време (t_i), в съответствие с уравнението: ⁽¹⁾

$$A_{t_i} = \frac{m_p^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (1)^1$$

Периодът може да се изчисли, както следва:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_p^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (3)$$

където:

A_{t_i} = процента адсорбция (%) при определено време t_i ;

$m_p^{\text{ads}}(t_i)$ = маса на тестваното вещество върху почвата при определено време t_i на извършване на теста (μg);

m_0 = маса на тестваното вещество в епруветката в началото на теста (μg);

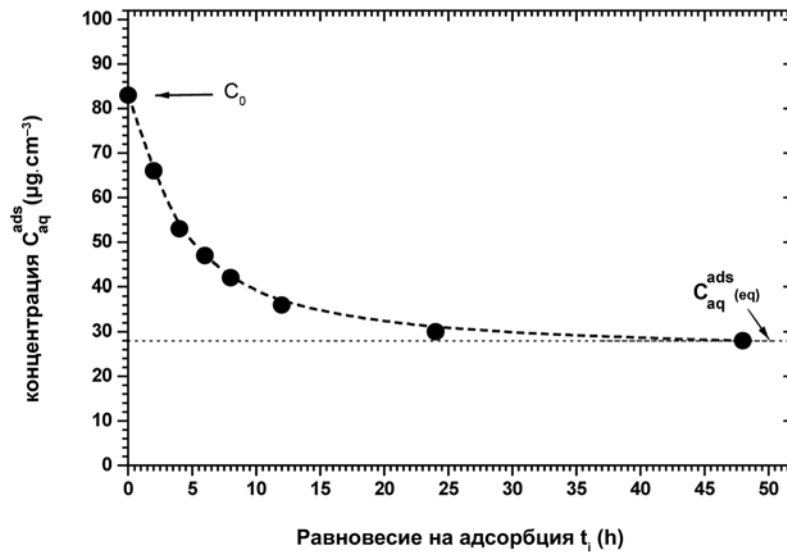
C_0 = първоначалната маса на тествания разтвор в контакт с почвата ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

▼ B

$C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(t_i)$ = съдържанието на тестваното вещество във водната фаза при определено време t_i на извършване на теста ($\mu\text{g cm}^{-3}$); така концентрацията се определя аналитично, като се взимат предвид стойностите, дадени по време на пускането на празен ход.

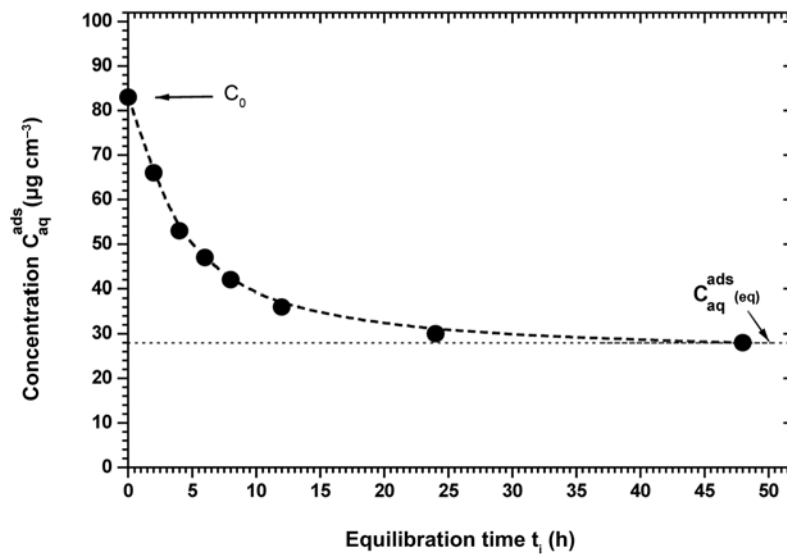
V_0 = първоначално количество на тествания разтвор в контакт с почвата (cm^3).

Стойностите на процента адсорбция A_{t_i} или $C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(t_i)$ се представят графично противоположно на времето и времето, след което се определя времето за постигане на равновесие на сорбция. Примери за такива графики са дадени респективно във фигури 1 и 2.



Фигура 1

Изобразяване на равновесието на адсорбция



Фигура 2

Концентрация на масата на тестваното вещество във водната фаза (C_{aq}) спрямо времето.

▼B

б) *Сериен метод*

При следните уравнения се взема предвид, че процедурата на адсорбция се извършва чрез измерване на тестваното вещество в малки аликвотни части на водната фаза, при определени интервали от време.

— По време на всеки интервал от време се изчислява количеството адсорбирано вещество върху почвата, както следва:

— за първия часови интервал $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_p^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A}\right) \quad (4)$$

— за втория часови интервал $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_p^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A}\right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - V_a^A}{V_a^A}\right) \quad (5)$$

— за третия часови интервал $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_p^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - V_a^A}{V_a^A}\right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot V_a^A}{V_a^A}\right) \quad (6)$$

— за n-ти часови интервал $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_p^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot V_a^A}{V_a^A}\right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot V_a^A}{V_a^A}\right) \quad (7)$$

— Процентът на адсорбция при всеки интервал от време $A_{\Delta t_i}$ се изчислява, като се използва следното уравнение:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_p^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (8)^1$$

докато процента на адсорбция A_{t_i} за време t_i е дадено с уравнението:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_p^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (9)^1$$

Стойностите на адсорбция A_{t_i} и $A_{\Delta t_i}$ (по отношение на нуждите на проучването) се изобразяват графично противоположно на времето и времето, след което се определя времето за постигане на равновесие на сорбция.

— При време на постигане на равновесие t_{eq} :

— масата на адсорбираното тествано вещество върху почвата е:

$$m_p^{\text{ads}}(\text{eq}) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_p^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (10)^1$$

▼ B

— масата на тестваното вещество в разтвора е:

$$m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (11)^1$$

— и процентът на адсорбция при постигане на равновесие е:

$$A_{\text{eq}} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (12)^1$$

Използваните по-горе параметри се определят като:

$m_p^{\text{ads}}(\Delta t_1), m_p^{\text{ads}}(\Delta t_2), \dots, m_p^{\text{ads}}(\Delta t_n)$ = масата вещество, адсорбирано върху почвата за интервали от време $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg);

$m_m^{\text{ads}}(t_1), m_m^{\text{ads}}(t_2), \dots, m_m^{\text{ads}}(t_n)$ = масата вещество, измерено в аликвотна част v_a^A за определено време t_1, t_2, \dots, t_n съответно (μg);

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = маса на адсорбираното вещество върху почвата при равновесие на адсорбция μg ;

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = маса на веществото в разтвора при равновесие на адсорбция μg ;

v_a^A = обем на аликвотната част, при която тестваното вещество се измерва (cm^3);

$A_{\Delta t_i}$ = процент адсорбция, съответстващ на интервала от време Δt_i (%);

A_{eq} = процент на адсорбция при равновесие на адсорбция (%).

ДЕСОРБЦИЯ (%)

Времето t_0 , когато започва експериментът на кинетиката на десорбция, се счита като момента, когато максимално възстановения обем тествано вещество в разтвора (след като е постигнато равновесие на адсорбция) се замества със същия обем 0,01 M CaCl₂ разтвор.

а) Паралелен метод

При определено време t_i масата на тествано вещество се измерва във водната фаза, взето от епруветка i (V_r^i) и масата на десорбция се изчислява съгласно уравнението:

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i) = m_m^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i}\right) - m_{\text{vod}}^A \quad (13)$$

При равновесие на десорбция $t_i = t_{\text{eq}}$ и следователно

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq}).$$

Масата на десорбираното вещество при интервал от време Δt_i е даден в уравнението:

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i) = m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{\text{vod}}^{\text{des}}(j) \quad (14)$$

Процентът на десорбция се изчислява:

при определено време t_i с уравнението:

▼ B

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100(\%) \quad (15)$$

и при интервал (Δt_i) с уравнението:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100(\%) \quad (16)$$

където:

D_{t_i} = процент на десорбция при определено време t_i (%);

$D_{\Delta t_i}$ = процент на десорбция, съответстващ на интервал от време Δt_i (%);

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)$ = масата на тестваното вещество, десорбирано при интервал от време t_i (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)$ = масата на тестваното вещество, десорбирано при интервал от време Δt_i (μg);

$m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i)$ = масата на тестваното вещество, измерено аналитично при време t_i в количество V_{r}^i , който е взет за анализа (μg);

m_{aq}^{A} = масата на тестваното вещество, останало от равновесието на адсорбция заради непълното заместване на количеството (μg);

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_{\text{R}}}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = масата на тествано вещество в разтвор при равновесие на адсорбция (μg);

V_{R} = обем на плаващите върху повърхността частици, отстранени от епруветката след постигане на равновесие на адсорбция и заместени със същото количество 0,01 M CaCl_2 разтвор (cm^3);

V_{r}^i = количеството почва, взето от епруветката (i) за измерване на тестваното вещество, в измерване на кинетиката на десорбция (cm^3).

Стойностите на десорбция D_{t_i} и $D_{\Delta t_i}$ (съгласно нуждите на проучването) се изобразяват графично противоположно на времето и времето, след което се определя постигане на равновесието на десорбция.

б) *Сериен метод*

При следното уравнение се взима предвид, че процедурата на адсорбция, която е предшествала, се е извършила чрез изчисляване на тестваното вещество в малка аликвотна част (v_{a}^{A}) от водната фаза (сериен метод в 1.9 „Извършване на теста“). Приема се че: а) количеството плаващи частици, отстранени от епруветката след експеримент за кинетиката на адсорбция, се заместват със същото количество 0,01 M CaCl_2 разтвор (V_{R}), и б) и общото количество на водната фаза в контакт с почвата (V_{T}) по време на експеримент за кинетиката на десорбция остава постоянно и е дадено в уравнението:

$$V_{\text{T}} = V_0 - \sum_{i=1}^n v_{\text{a}}^{\text{A}}(i) \quad (18)$$

▼ B

При време t_i :

- масата на тестваното вещество се измерва в малка аликвотна част (v_a^D) и десорбната маса се изчислява съгласно уравнението:

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{\text{vod}}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) \quad (19)$$

- при равновесие на десорбция $t_i = t_{\text{eq}}$ и следователно

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq}).$$

- Процентът на десорбция D_{t_i} се изчислява чрез следното уравнение:

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 (\%) \quad (20)$$

При интервал от време Δt_i :

По време на всеки интервал от време количеството десорбирано вещество се изчислява, както следва:

- за първия часови интервал $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_1) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{\text{vod}}^A \quad \text{а} \quad m_{\text{p}}^{\text{des}}(t_1) = m_{\text{p}}^{\text{vod}}(\text{eq}) - m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \quad (21)$$

- за втория часови интервал $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_2) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) - m_{\text{vod}}^A \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) \quad (22)$$

$$m_{\text{p}}^{\text{des}}(t_2) = m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - [m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_1) + m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_2)]$$

- за n -ти часови интервал $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_n) = \left[m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{\text{vod}}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i)\right) \right]$$

$$\text{и} \quad m_{\text{p}}^{\text{des}}(t_n) = m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Накрая при всеки интервал от време $D_{\Delta t_i}$ се изчислява със следното уравнение:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 (\%) \quad (24)$$

докато процентът на десорбция D_{t_i} при време t_i е даден чрез следното уравнение:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{t_i} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 (\%) \quad (25)$$

▼B

където гореспоменатите параметри се определят, както следва:

$m_s^{\text{des}}(\Delta t_1), m_s^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_s^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = масата вещество, останало адсорбирано върху почвата след интервали от време $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ респективно (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = масата вещество, останало адсорбирано върху почвата след интервали от време $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ респективно (μg);

$m_m^{\text{des}}(t_1), m_m^{\text{des}}(t_2), \dots, m_m^{\text{des}}(t_n)$ = масата вещество, измерено в аликвотна част (v_a^{D}) за определено време t_1, t_2, \dots, t_n съответно (μg);

V_T = общо количество на водната фаза в контакт с почвата през време на експеримента на кинетика на десорбция, извършен със сериен метод (cm^3);

m_{aq}^{A} = масата на тестваното вещество, останало от равновесието на адсорбция заради непълното заместване на количеството (μg);

$$m_{\text{vod}}^{\text{A}} = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^{\text{A}}(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^{\text{A}}(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

V_R = обем на плаващите върху повърхността частици, отстранени от епруветката след постигане на равновесие на адсорбция и заместени със същото количество 0,01 M CaCl_2 разтвор (cm^3);

v_a^{D} = количество аликвотна част, изпробвана за аналитични цели от епруветката (i) по време на експеримент на кинетиката на десорбция, извършен със сериен метод (cm^3);

$$v_a^{\text{D}} \leq 0,02 \cdot V_T \quad (27)$$

▼B

	Знак	Единици	Време на равновесиет 0	Време на равновесиет 0	Време на равновесиет 0	Време на равновесиет 0
След разбъркване и центрофугиране						
НЕПРЯК МЕТОД						
Паралелен метод						
Концентрация на тестваното вещество при водната фаза, включително и корекция на празна проба	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Сериен метод						
Измерена маса на тестваното вещество в аликвотна част	$m_m^{ads}(t_i)$	μg				
ПРЯК МЕТОД						
Маса на тестваното вещество, адсорбирано от почвата	$m_s^{ads}(t_i)$	μg				
Изчисление на адсорбцията						
Адсорбция	A_{t_i}	%				
	$A_{\Delta t_i}$	%				
Средства						
Коефициент на адсорбция	K_d	$\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$				
Средства						
Коефициент на адсорбция	K_{oc}	$\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$				
Средства						

Тествано вещество:

Тествана почва:

Съдържание на суха маса в почвата (105 °C, 12 h): %

Температура: °C

Адсорбционен тест: празни проби и контроли

	Знак	Единици	Празни проби		Празни проби		Контроли	
Епруветка №								
Претеглена почва		g					0	0
Количество вода в претеглената почва (изчислено)		cm^3						
Добавено количество от 0,01 M разтвор на CaCl_2		cm						
Добавено количество от основен разтвор на тестваното вещество		cm^3	0	0				
Пълен обем на водната фаза (изчислено)		cm^3					—	—

▼B

	Знак	Единици	Празни проби		Празни проби		Контроли	
Начална концентрация на тестваното вещество във водната фаза		$\mu\text{g cm}^{-3}$						

След разбъркване и центрофугиране

Концентрация във водната фаза		$\mu\text{g cm}^{-3}$						
-------------------------------	--	-----------------------	--	--	--	--	--	--

Забележка: Добавете колони, ако е необходимо.

Тествано вещество:

Тествана почва:

Съдържание на суха маса в почвата (105 °C, 12 Б): %

Температура: °C

Баланс на масата

	Знак	Единици				
Епруветка №						
Претеглена почва	—	g				
Почва: суха маса	$m_{\text{почва}}$	g				
Обем на водата в претеглената почва (изчислено)	V_{ws}	ml				
Обем на 0,01 М разтвор на CaCl_2 за изравняване на почвата		ml				
Обем на основния разтвор		cm^3				
Пълен обем на водната фаза при контакт с почвата	V_0	cm^3				
Начална концентрация на тествания разтвор	C_0	$\mu\text{g.cm}^{-3}$				
Време на равновесието	—	h				

След разбъркване и центрофугиране

Концентрация на тестваното вещество при водната фаза, включително и корекция на празна проба	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	$\mu\text{g.cm}^{-3}$				
Равновесие на адсорбцията	t_{eq}	h				

Първо разреждане с разтворител

Отстранен обем на водната фаза	V_{rec}	cm^3				
Добавен обем разтворител	Δv	cm				

Първа екстракция с разтворител

Сигнал при анализ на разтворител	S_{E1}	различни				
Концентрация на тестваното вещество в разтворител	C_{E1}	$\mu\text{g.cm}^{-3}$				

▼B

	Знак	Единици				
Маса на веществото, екстрахирано от почвата и от стените на съда	m_{E1}	μg				
Второ разреждане с разтворител						
Отстранен обем разтворител	Δv_S	cm^3				
Добавен обем разтворител	Δv	cm				
Втора екстракция с разтворител						
Сигнал при анализ на разтворимата фаза	S_{E2}	различни				
Концентрация на тестваното вещество в разтворител	C_{E2}	$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$				
Маса на веществото, екстрахирано от почвата и от стените на съда	m_{E2}	μg				
Пълна маса на тестваното вещество, екстрахирано на два етапа	m_E	μg				
Баланс на масата	MB	%				

Тествано вещество:

Тествана почва:

Съдържание на суха маса в почвата (105 °C, 12 h): %

Температура: °C

Адсорбни изотерми

	Символ	Единица							
Епруветка №									
Претеглена почва	—	g							
Почва: суха маса	E	g							
Обем на водата в претеглената почва (изчислено)		cm^3							
Обем на 0,01 M разтвор на CaCl_2 за изравняване на почвата		cm							
Обем на основния разтвор		cm^3							
Пълен обем на водната фаза при контакт с почвата (изчислено)	V_0	cm							
Концентриран разтвор		$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$							
Равновесие на адсорбцията	—	h							

▼ **B**

		Символ	Единица								
След разбъркване и центрофугиране											
Концентрация на тестваното вещество при водната фаза, включително и корекция на празна проба		C_{aq}^{ads} (eq)	$\mu\text{g cm}^{-3}$								
Температура			$^{\circ}\text{C}$								
Маса на адсорбцията за единица почва		C_s^{ads} (eq)	$\mu\text{g-g}^{-1}$								

Регресен анализ:

стойност K_F^{ads} :стойност на $1/n$:регресен коефициент r^2 :

Тествано вещество:

Тествана почва:

Съдържание на суха маса в почвата (105°C , 12 п): %Температура: $^{\circ}\text{C}$

Използва се аналитичният метод: Непряк Паралелен Сериен

 Пряк

Тест за десорбция

		Символ	Единица	Времеви интервал	Времеви интервал	Времеви интервал	Времеви интервал
Епруетка № от етап на адсорбция							
Маса на веществото адсорбирано в почвата при равновесие на адсорбция		m_s^{ads} (eq)	μg				
Отстранен обем при водна фаза, заменена от $0,01 \text{ M CaCl}_2$		V_R	cm^3				
Пълнен обем на водната фаза при контакт с почва	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Маса на тестваното вещество, останало след равновесие на адсорбцията в резултат на непълно възстановяване на обема		m_{vod}^A	μg				

Киветика на десорбцията

Претеглена маса на веществото, отделено от почвата за време t_i		$m_m^{des}(t_i)$	μg				
Обем на разтвора взет от епруетка 0) за измерване на тестваното вещество	PM	V_r^i	cm^3				
	SM	V_a^D	cm^3				
Маса на веществото отделено от почвата във време t_i (изчислено)		$m_{vod}^{des}(t_i)$	μg				
Маса на веществото отделено от почвата във времеви интервал Δt_i (изчислено)		$m_{vod}^{des}(\Delta t_i)$	μg				

▼B

	Символ	Единица	Времени интервал	Времени интервал	Времени интервал	Времени интервал
Процент на десорбция						
Десорбция във време t_i	D_{t_i}	%				
Десорбция във времеви интервал Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Видим коефициент на десорбция	K_{des}					

PM: паралелен метод

SM: сериен метод

▼B

В.19. ИЗЧИСЛЯВАНЕ КОЕФИЦИЕНТА НА АДСОРБЦИЯ (K_{oc}) НА ПОЧВАТА И НА УТАЙКАТА ОТ ОТПАДНИ ВОДИ, ИЗПОЛЗВАЩИ ВИСОКОЕФЕКТИВНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ (HPLC)

1. МЕТОД

Този метод е точно копие на OECD TG 121 (2001).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Поведението на веществата при сорбция в почвите или в утайките от отпадни води може да се опише чрез параметрите, които са определени със средствата на метода В.18. Важен параметър е коефициентът на адсорбция, който се определя като съотношение между концентрацията на веществото в почвата/утайката и концентрацията на веществото във водната фаза при равновесие на адсорбция. Коефициентът на адсорбция, нормализиран към съдържанието на органичен въглерод в почвата K_{oc} , е полезен индикатор на свързващата способност на химикала с органичните частици на почвата и утайката от отпадни води и позволява да се направи сравнение между различните химикали. Този параметър може да се изчисли чрез корелация с водоразтворимостта и коефициента на разделяне н-октанол/вода (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Методът на извършване на експеримента, който е описан при този тест, използва HPLC за изчисляване на коефициента на адсорбция K_{oc} в почвите или в утайките от отпадни води (8). Изчисленията са по-надеждни от тези на QSAR (9). Като метод на изчисляване не може напълно да замени експериментите за равновесие на подбора, използван при метод на тестване В.18. Обаче изчисленият K_{oc} може да е полезен при избиране на подходящи параметри за проучванията на адсорбция/десорбция, съгласно метод В.18 чрез изчисляване на K_d (коефициент на разпределяне) или K_f (коефициент на адсорбция на Фройндлих) съгласно уравнение 3 (вж. точка 1.2).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

K_d : коефициентът на разпределяне се определя като съотношение на концентрацията при равновесие C на разтвореното тествано вещество в двете системи фази, съдържащ сорбиращо вещество (почва или утайка) и водната фаза; той е с много малка стойност, когато концентрациите при двете фази се изразяват на основата на тегло/тегло. В случаите, когато е дадена концентрацията във водната фаза на основата на тегло/обем, тогава единиците са $ml\ g^{-1}$. K_d може да варира със свойството сорбция и може да зависи от концентрацията.

$$K_d = \frac{C_{почва}}{C_{вода}} \text{ или } \frac{C_{утайка}}{C_{вода}} \quad (1)$$

където:

$C_{почва}$ = концентрация тествано вещество в почвата при равновесие ($\mu g\ g^{-1}$)

$C_{утайка}$ = концентрация тествано вещество в утайките при равновесие ($\mu g\ g^{-1}$)

$C_{вода}$ = концентрация тествано вещество във водната фаза при равновесие ($\mu g\ g^{-1}$, $\mu g\ ml^{-1}$).

▼B

K_f : коефициент на адсорбция на Фройндлих се определя като концентрация на тестваното вещество в почвата или утайките (x/m), когато концентрацията на равновесие $C_{\text{вода}}$ във водната фаза е равна на едно; единиците са $\mu\text{g g}^{-1}$ сорбиращо вещество. Стойността може да варира със свойствата на сорбиращото вещество.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{\text{aq}} \quad (2)$$

където:

x/m = количеството тествано вещество x (μg), адсорбирано върху количеството сорбиращо вещество m (g) при равновесие

$1/n$ = наклон на изотерма на адсорбция на Фройндлих

$C_{\text{вода}}$ = концентрация тествано вещество във водната фаза при равновесие ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

ПРИ $C_{\text{вода}} = 1$; $\log K_f = \log \frac{x}{m}$

K_{oc} : коефициент на разпределяне (K_d) или коефициент на адсорбция на Фройндлих (K_f), нормализирани към съдържанието на органичен въглерод (f_{oc}) на сорбиращото вещество; по-специално за нейонизираните химикали той е приблизителен индикатор за степента на адсорбция между веществото и сорбиращото вещество и позволява да се направи сравнение между различните химикали. В зависимост от размера на K_d и K_f , K_{oc} може да е с много малка стойност или има единици ml g^{-1} или $\mu\text{g g}^{-1}$ органични частици.

$$K_{\text{oc}} = \frac{K_d}{f_{\text{oc}}} \text{ (без изменение или в } \text{ml} \cdot \text{g}^{-1}\text{) или } \frac{K_f}{f_{\text{oc}}} \text{ (} \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

Отношението между K_d и K_{oc} не е винаги линейно и тогава K_{oc} стойностите могат да варират от почва до почва, но тяхната променливост е много намалена в сравнение с K_d и K_f стойностите.

Коефициентът на адсорбция (K_{oc}) се извлича от коефициента на използване на мощността (k') в зависимост от кривата за калибриране на $\log k'$ като функция на $\log K_{\text{oc}}$ от избраните съединения еталони.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

където:

t_R = HPLC време на запазване на теста и вещество еталон (минути)

t_0 = HPLC време на престой (минути) (вж. точка 1.8.2).

P_{ow} : коефициент на разделяне октанол-вода се определя като съотношение на концентрациите на разтворено вещество в n -октанол и вода; той е с много малка стойност.

$$P_{\text{ow}} = \frac{C_{\text{октанол}}}{C_{\text{вода}}} (= K_{\text{ow}}) \quad (5)$$

1.3. ВЕЩЕСТВА ЕТАЛОНИ

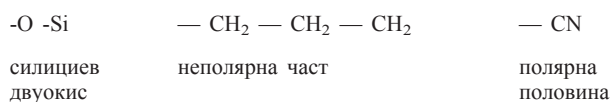
Структурната формула, чистотата и константната на разпадане (ако е целесъобразно) трябва да се знаят преди използването на метода. Използва се информацията за разтворимост във вода и органични разтвори, върху коефициент на разделяне октанол-вода и характеристиките на хидролизата.



За да се съпоставят измерените HPLC данни за запазване на тестваното вещество с неговия коефициент на адсорбция K_{oc} трябва да се състави графика на калибриране с $\log K_{oc}$ в съответствие с $\log k$. Използват се минимум шест точки еталони, поне една отгоре и една отдолу на очакваната стойност на тестваното вещество. Точността на метода ще бъде значително подобрена, ако се използват веществата еталони, които структурно се отнасят към тестваното вещество. Ако не са налице такива данни, тогава ползвателят избира подходящите вещества на калибриране. В този случай се избира по-основна мрежа от структурно хомогенни вещества. Веществата и K_{oc} стойности, които могат да се използват, са изброени в приложението в таблица 1 за утайките и в таблица 3 за почвата. Посочват се причините за избор на други вещества на калибриране.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ТЕСТА

HPLC се извършва с аналитични колони, свързани с цианопропил твърда фаза, съдържащи липофилна и полярна половина. Използва се умерено стационарна фаза, основана на кварцова матрица:



Принципът на метода на теста е подобен на метода на тестване А.8 (коефициент на разпределяне, HPLC метод). Докато преминава през колоните заедно с мобилната фаза, тестваното вещество взаимодейства със стационарната фаза. Като резултат от разпределянето между мобилната и стационарната фаза, тестваното вещество се забавя. Двойният състав на стационарната фаза, имащ полярна и неполярна страна, позволява взаимодействие с полярните и неполярните групи от молекули по начин, подобен на случая за органичните частици в матриците почва или утайка. Това позволява да се създаде отношение между времето за задържане в колоната и коефициента на адсорбция на органичните частици.

pH има значително въздействие върху поведението при сорбция, и по-специално за полярните вещества. За земеделските почви или утайници на станциите за преработване на утайките от отпадни води pH обикновено варира между 5,5 и 7,5. За веществата, които се йонизират, трябва да се извършат два теста с йонизирана и нейонизирана форма при подходящ буферен разтвор, но само в случаи, когато поне 10 % от тестваното съединение ще се дисоциират в pH от 5,5 до 7,5.

Тъй като отношението между задържането на HPLC колона и коефициента на адсорбция се използват за изчисление, не се изисква количествен аналитичен метод и са необходими само изчисленията на времето за задържане. Ако е на разположение подходяща мрежа от вещества еталони и могат да се използват стандартните условия за извършване на експериментите, методът осигурява бърз и ефикасен метод за оценяване на коефициента на адсорбция K_{oc} .

1.5. ПРИЛОЖИМОСТ НА ТЕСТА

HPLC метод се прилага за химичните вещества (не-етикетирани или етикетирани), за които е налице подходяща система за откриване (например спектрометър, радиоактивен детектор) и които са достатъчно устойчиви по време на експеримента. Може по-специално да бъде полезен за химикали, които е трудно да се изследват в други експериментални системи (т.е. летливи вещество; вещества, които не са разтворими във вода при концентрация, която може да се измери аналитично; веществата с високо сродство към повърхността на инкубационната система). Методът може да се използва за смеси, които дават неразделни отмити ивици. В такъв случай се формулират горните и долни ограничения на $\log K_{oc}$ стойности на съединенията на тестваната смес.

▼B

Примесите могат понякога да причинят проблеми при тълкуването на резултатите от HPLC, но те не са от голямо значение, когато тестваното вещество може да бъде аналитично ясно определено и разделено от примесите.

Методът е валиден за веществата, които са изброени в таблица 1 на приложението и също са приложими за различните видове химикали, принадлежащи на следните класове:

- ароматни амини (например: трифлуралин, 4-хлороанилин, 3,5-динитроанилин, 4- метиламин, N-метиламин, 1-нафтамин),
- ароматни естери на карбоксилните киселини (например: метилестер на бензонената киселина, 3,5- естер динитробензонената киселина),
- ароматни хидрокарбони (например толуол, ксилол, етилбензол, нитробензол),
- естери на арилоксифеноксипропиоловите киселини (например диклофоп-метил, феноксапроп-етил, феноксапроп-Р-етил)
- бензимидазол и имидазол фунгициди (например карбендазим, фуберидазол, триазоксид),
- амиди на карбоксилните киселини (например 2-хролбензамид, N, N-диметилбензамид, 3,5-динитробензамид, N-метилбензамид, 2-нитробензамид, 3-нитробензамид),
- хлорирани въглеродороди (например ендосулфан, дихлордифенил-трихлоретан, хексахлорбензен, квинтозен, 1,2,3-трихлорбензен),
- органофосфор инсектициди (например азинфос-метил, дизульфотон, фенамифос, изофенфос, пиразофос, сулпрофос, тризофос),
- феноли (например фенол, 2-нитрофенол, 4-нитрофенол, пентахлорфенол, 2,4,6-трихлорфенол, 1-нафтол),
- фенилурея производни съединения (например изопротурон, монолинурон, пенсикурон),
- багрилни вещества (например Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81),
- полиароматни хидрокарбони (например аценафтен, нафталин),
- 1,3,5-триазин хербициди (например прометрин, пропазин, симазин, тербутрин),
- триазол производни съединения (например тебуконазол, тридимефон, традименол, трипенфенол),

Методът не се прилага за вещества, които реагират или с отмиващ агент или със стационарната фаза. Също не се прилага за вещества, които взаимодействат по специфичен начин с неорганични съединения (например образуване на група от комплекси с глинени минерали). Методът може да не работи за повърхностните активни вещества, неорганичните съединения и умерените и силни органични киселини и основи. Могат да се определят $\log K_{oc}$ стойности с обхват от 1,5 до 5,0. Веществата, които се йонизират трябва да се измерят като се използва буферна мобилна фаза, но се вземат грижи за да се избегне утаяване на буферни съединения или тестваното вещество.

▼B**1.6. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО****1.6.1. Точност**

Обикновено коефициента на адсорбция на тестваното вещество може да се изчисли с $\pm 0,5 \log$ единици на стойността, определена чрез метода за равновесие на Фройндлих (виж таблица 1 в допълнението). По-висока точност може да се постигне, ако използваните вещества-еталони структурно се отнасят към тестваното вещество.

1.6.2. Повтаряемост

Изчисленията следва да се правят поне два пъти. Стойностите на $\log K_{OC}$, получени от индивидуалните изследвания са в обхват от 0,25 \log единици.

1.6.3. Възпроизводимост

Полученият досега опит при прилагането на този метод се поддържа от неговата валидност. Проучванията на HPLC метод, който използва 48 вещества (повечето пестициди), за които има данни, отнасящи се до K_{OC} върху почвата, дават коефициента на корелация $R = 0,95$ (10) (11).

Направено е сравнение на теста между 11 участващи лаборатории, за да се подобри и валидира методът (12). Резултатите са дадени в таблица 2 от приложението.

1.7. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**1.7.1. Предварителна оценка на коефициента на адсорбция**

Коефициентът на разделение на октанол-вода $P_{ow} = (K_{ow})$, и до някаква степен разтворимостта във вода може да се използват като индикатори за степента на адсорбция, по-специално за нейонизираните вещества, и по този начин може да се използват за предварителни сведения. Разнообразието от полезни корелации е било публикувано за няколко групи химикали (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. Апаратура

Изисква се течен хроматограф, оборудван с пулсационна помпа и подходящ уред за откриване. Препоръчва се използването на инжекционен клапан с отвор за впръскване. Използват се химично свързани с цианопропил смоли на основата на силициев двуокис (например Хайперсил и Зорбакс CN). Колоната на безопасност от същия материал може да бъде поставена между системата за впръскване и аналитичната колона. Колоните от различните доставчици могат да варират значително в тяхната отделна ефективност. Като ръководство, се постигат следните фактори за капацитет k' : $\log k' > 0,0$ за $\log K_{OC} = 3,0$ И $\log k' > -0,4$ за $\log K_{OC} = 2,0$, когато се използва метанол/вода 55/45 % като мобилна фаза.

1.7.3. Мобилни фази

Проучени са няколко мобилни фази и се препоръчват следните две:

— метанол/вода (55/45 % v/v),

— метанол/0,01 М цитрат-буфер pH 6,0 (55/45 % v/v).

▼B

За приготвянето на цитрат-буферен разтвор се използват HPLC степен на метанола и дестилираната вода или отмиващ разтвор. Преди употреба сместа се дегазира. Използват се изократни отмиващи агенти. Ако метанолът/водната смес не са подходящи, могат да се опитат други органични разтворители/водни смеси, например етанол/водна смес или ацетонитрил/водна смес. За съединенията, които се йонизират, за да стабилизират pH, се препоръчва употребата на отмиващ разтвор. Трябва да се полагат грижи, за да се избегне утаяването на солта и влошаване/разваляне на колоните, което може да се случи с някои органични фази/буферни смеси.

Не могат да се използват никакви добавки като йон реактив, защото те могат да повлияят на свойството на сорбция на стационарната фаза. Такива изменения на стационарната фаза може да са необратими. Поради тази причина е задължително тези експерименти, за които се използват добавки, да се извършват в отделна колона.

1.7.4. Разтворими вещества

Тестваните вещества и веществата еталони следва да се разтварят през мобилната фаза.

1.8. ИЗВЪРШВАНЕ НА ТЕСТА**1.8.1. Условия на извършване на теста**

Температурата по време на измерването следва да се записва. Използването на отделна колона за контролиране на температурата се препоръчва силно, за да се гарантират постоянните условия по време на калибриране и извършването на оценка и измерване на тестваното вещество.

1.8.2. Определяне на времето на престой t_0

За определяне на времето на престой t_0 могат да се използват два различни метода (вж. точка 1.2).

1.8.2.1. *Определяне на времето на престой t_0 чрез хомологусни серии*

За тази процедура е доказано, че дава надеждни резултати и стандартизирани стойности t_0 . За подробности вижте метод A.8: коефициент на разделяне (n-октанол/вода), HPLC метод.

1.8.2.2. *Определяне на времето на престой t_0 чрез инертни вещества, които не се задържат чрез колона*

Тази техника се основава на впръскването на разтворите от формамид, урея и содни нитрати. Извършват се измервания поне два пъти.

1.8.3. Определяне на времето на задържане t_R

Веществата еталони се избират, както е описано в точка 1.3. Те могат да се впръскат като смесен стандарт, за да се определи тяхното време на задържане, при условие че е било потвърдено, че времето на задържане на всяко вещество еталон не е повлияно от присъствието на други стандарти еталони. Калибрирането се извършва на равни интервали поне два пъти на ден с цел да се изчислят неочакваните промени в колоната за изпълнение. За да се потвърди, че времето на задържане не се е натрупало и за да се постигне най-добър опит, калибрираното впръскване се извършва преди и след впръскването на тестваното вещество. Веществата се впръскват поотделно в колкото е възможно по-малко количество (за да се избегне претрупване на колоната) и се определя тяхното време на задържане.

▼B

С цел да се повиши коефициентът в измерването, следва да се извършват поне две измервания. Стойностите на $\log K_{oc}$, получени от индивидуалните измервания, попадат в обхвата на 0,25 \log единици.

1.8.4. Оценка

Факторите на капацитета k' се изчисляват от времето на престой t_o и времето на задържане t_R на избраните вещества еталони в съответствие с уравнение 4 (вж. точка 1.2). Данните за $\log k'$ на веществата еталони след това са изобразени графично срещу техните $\log K_{oc}$ стойности от експеримента за изравняване на партидата, даден в таблици 1 и 3 от приложението. Следователно, използвайки тази схема, $\log k'$ стойността на тестваното вещество се използва, за да се определи неговата $\log K_{oc}$ стойност. Ако фактическите резултати показват, че $\log K_{oc}$ на тестваното вещество е извън обхвата на калибриране, тестът следва да се извърши отново, като се използват различни, по-подходящи вещества еталони.

2. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

Отчетът трябва да включва следната информация:

- идентификация на тестваното вещество и веществата еталони и тяхната чистота, и pK_a , ако е необходимо,
- описание на оборудването и условията на работа, например вида и размера на аналитичната (и за безопасност) колона, средствата за установяване, мобилната фаза (съотношение на компонентите и pH), температура по време на измерванията,
- времето на престой и използваният за неговото определяне метод,
- количествата тествано вещество и веществата еталони, въведени в колоната,
- време на задържане на съединенията еталони, използвани за калибриране,
- подробности за съответстващата линия на регресия ($\log k'$ в съотношение с $\log K_{oc}$ и графиката на линията на регресия,
- средните данни за задържането и изчислената стойност $d \log K_{oc}$ за тестваните химически съединения,
- хроматограми.

3. ПРЕПРАТКИ

- (1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.
- (2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by CLIP. Chemosphere, 17, 1—67.
- (3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050—1059.
- (4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp. 227—231.
- (5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297—312.

▼B

- (6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, *Science*, 106, pp. 831—832.
- (7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. *Chemosphere*, 10, pp. 833—846.
- (8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. *Chemosphere*, 35(1/2), pp. 121—128.
- (9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. *Chemosphere*, 32(12), pp. 2493—2504.
- (10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, *Chemosphere*, 27(12), pp. 2341—2352.
- (11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, *Chemosphere*, 22, pp. 285—304.
- (12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. *Chemosphere*, 30(7), pp. 1373—1384.



Приложение

Таблица 1

Сравнение на стойностите на K_{oc} за почвите и утайките и изчислените стойности чрез HPLC скрининг метод ⁽¹⁾, ⁽²⁾

Вещество	CAS номер	log K_{oc} на утайки от отпадни води	log K_{oc} на HPLC	Δ	log K_{oc} на почвата	log K_{oc} на HPLC	Δ
Атразин	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Линурон	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Фентион	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Монурон	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Фенантрен	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Фенилбензоат	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Бензамид	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-нитробензамид	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Ацетанилид	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Анилин	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-дихлоранилин	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

⁽¹⁾ W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121—128.

⁽²⁾ W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107—119.

Таблица 2

Резултати от междулабораторния тест (11 участващи лаборатории), извършен, за да подобри и валидира HPLC метода ⁽¹⁾

Вещество	CAS номер	log K_{oc}	K_{oc}	log K_{oc}
		(OECD 106)	HPLC	
Атразин	1912-24-9	1,81	78+16	1,89
Монурон	150-68-5	1,99	100+8	2,00
Трипентенол	77608-88-3	2,37	292 ±58	2,47
Линурон	330-55-2	2,59	465 ±62	2,67
Фентион	55-38-9	3,31	2062 ±648	3,31

⁽¹⁾ W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.



Таблица 3

Препоръчани вещества еталони за HPLC екранен метод, основан на данните за адсорбция на почвата

Вещество еталон	CAS номер	Log K _{oc} е стойност на равновесието	Номер на данни	Log S.D.	Източник
Ацетанилид	03-84-4	1,25	4	0,48	(^a)
Фенол	108-95-2	1,32	4	0,70	(^a)
2-нитробензамид	610-15-1	1,45	3	0,90	(^b)
N, N-диметилбензамид	611-74-5	1,52	2	0,45	(^a)
4-метилбензамид	619-55-6	1,78	3	1,76	(^a)
Метилбензоат	93-58-3	1,80	4	1,08	(^a)
Атразин	1912-24-9	1,81	3	1,08	(^c)
Изопропурун	34123-59-6	1,86	5	1,53	(^c)
3-Нитробензами д	645-09-0	1,95	3	1,31	(^b)
Анилин	62-53-3	2,07	4	1,73	(^a)
3,5-Динитробензамид	121-81-3	2,31	3	1,27	(^b)
Карбендазим	10605-21-7	2,35	3	1,37	(^c)
Триадименол	55219-65-3	2,40	3	1,85	(^c)
Триазоксид	72459-58-6	2,44	3	1,66	(^c)
Триазофос	24017-47-8	2,55	3	1,78	(^c)
Линурон	330-55-2	2,59	3	1,97	(^c)
Нафтален	91-20-3	2,75	4	2,20	(^a)
Ендосулфан-диол	2157-19-9	3,02	5	2,29	(^c)
Метиокарб	2032-65-7	3,10	4	2,39	(^c)
Киселина жълто 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(^a)
1,2,3-Трихлорбензол	87-61-6	3,16	4	1,40	(^a)
γ-НСН (линдан)	58-89-9	3,23	5	2,94	(^a)
Фентион	55-38-9	3,31	3	2,49	(^c)
Директно червено 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(^c)
Пиразофос	13457-18-6	3,65	3	2,70	(^c)
Алфа- ендосулфан	959-98-8	4,09	5	3,74	(^c)
диклофопметил	51338-27-3	4,20	3	3,77	(^c)
Фенантрен	85-01-8	4,09	4	3,83	(^a)
Основно синьо 41 (смес)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	(^a)
ддт	50-29-3	5,63	1	—	(^b)

(^a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).

(^b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285—304

(^c) Údaje poskytnuté průmyslem.

▼ **M7****В.20. ИЗПИТВАНЕ ЗА РАЗМНОЖАВАНЕ НА *DAPHNIA MAGNA*****ВЪВЕДЕНИЕ**

Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 211 (2012). Насоките за изпитване на ОИСП периодично се преразглеждат в контекста на научния напредък. Насоките за изпитване за размножаване 211 произхождат от Насоки за изпитване 202, част II, изпитване за размножаване на *Daphnia* sp. (1984). Като цяло е прието, че данните от изпитванията, проведени съгласно тази TG 202, могат да варират. Това доведе до значителни усилия за идентифициране на причините за това вариране с цел създаване на по-добър метод за изпитване. Насоките за изпитване 211 се основават на резултатите от тези научноизследователски дейности, кръгови изпитвания и изследвания за валидиране 1992 (1), 1994 (2) и 2008 (3).

Основните разлики между първата (TG 202, 1984) и втората версия (TG 211, 1998) на насоките за изпитване за размножаване са:

- препоръчваният за използване вид е *Daphnia magna*;
- продължителността на изпитването е 21 дни;
- при полустатичните изпитвания броят на животните, които следва да се използват за всяка изпитвана концентрация, се намалява от най-малко 40, за предпочитане разделени на четири групи по 10 животни, до най-малко 10 животни, отглеждани индивидуално (въпреки че за проточните изпитвания могат да се използват различни планове);
- бяха отправени по-специфични препоръки по отношение на средата за изпитване и условията на хранене.
- Основните разлики между втората версия на насоките за изпитване за размножаване (TG 211, 1998) и настоящата версия са:
- добавя се допълнение 7, за да се опишат процедурите за идентификация на пола на новороденото, ако се изисква. В съответствие с предходните версии на настоящия метод за изпитване, съотношението между половете е незадължителна крайна точка;
- зависимата променлива брой на живото поколение, получено от едно преживяло родителско животно, е допълнена с допълнителна зависима променлива за размножаването на *Daphnia*, а именно общ брой живо поколение, получено в края на изпитването от един родител от родител *Daphnia* в началото на изпитването, като от анализа се изключва случайната и/или непреднамерена смъртност при родителите. Целта на допълнителната зависима променлива е да приведе тази зависима променлива в съответствие с други методи за изпитване с размножаване при безгръбначни животни. Освен това, по отношение на тази зависима променлива е възможно при този метод за изпитване да се премахне източник на грешки, а именно влиянието на непреднамерената и/или случайната смъртност при родителите, ако това се случи по време на периода на експозиция.
- Както за подхода с ЕСх (напр. ЕС 10 и ЕС50), така и за този с НОЕС/ЛОЕС, бяха включени допълнителни статистически насоки за планиране на изпитването и за обработка на резултатите.
- Въвежда се гранично изпитване.

Определенията, които са използвани, са дадени в допълнение 1.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

Първоначалната цел на изпитването е оценяване въздействието на химикалите върху репродуктивната способност на *Daphnia magna*. За тази цел млади женски животни *Daphnia* (родителски животни) на възраст по-малко от 24 часа при започването на изпитването се експонират на изпитваното вещество, прибавено към водата в обхват от концентрации. Изпитването продължава 21 дни. В края на изпитването се оценява общият брой получено живо поколение. Репродуктивната способност на родителските животни може да се изрази по друг начин (например броя на живото поколение, произлязло от животно за един ден от първия ден, когато е наблюдавано поколение), но тези начини трябва да се отчетат като допълнение

▼ **M7**

към общия брой живо поколение, получено в края на изпитването. Поради особено планиране на полустатичното изпитване в сравнение с други методи за изпитване за размножаване с безгръбначни, възможно е също да се отчита броят на живото поколение, произлязло от всяко отделно родителско животно. Това дава възможност, за разлика от други методи за изпитване за размножаване с безгръбначни, ако родителското животно умре случайно и/или непреднамерено през периода на изпитването, неговото поколение да може да бъде изключено от оценката на данните. Следователно, ако се появи смъртност при родителите в подложени на експозиция повторения, следва да се разгледа дали смъртността следва модел концентрация-отклик, например ако е налице значима регресия при отклика спрямо концентрацията на изпитвания химикал с положителен наклон (за това може да се използва статистически тест, подобен на трендовия тест на Кокрън-Армитидж). Ако смъртността не следва модел концентрация-отклик, тогава тези повторения с родителска смъртност следва да бъдат изключени от анализа на резултата от изпитването. Ако смъртността следва модел концентрация-отклик, смъртността при родителите следва да бъде представена като ефект на изпитвания химикал и повторенията не следва да бъдат изключени от анализа. Ако родителското животно умре по време на изпитването, т.е. случайно поради неправилно боравене или произшествие, или непреднамерено поради неизяснен инцидент, който не е свързан с въздействието на изпитвания химикал, или ако се окаже, че е мъжки индивид, тогава повторението се изключва от анализа (вж. повече в точка 51). Токсичното въздействие на изпитвания химикал върху репродуктивната способност се изразява като ЕСх чрез изглаждането на данните към подходящ модел чрез нелинейна регресия, за да се оцени концентрацията, която би причинила съответно x % намаляване на репродуктивната способност, или алтернативно като стойност NOEC/LOEC (4). *За предпочитане е изпитваните концентрации да са разположени от двете страни на най-ниската от използваните концентрации с определен ефект (напр. ЕС₁₀), което означава, че тази стойност се изчислява чрез интерполация, а не чрез екстраполация.*

Преживяемостта на родителските животни и времето на появяване на първото поколение трябва да се протоколират. Може също да се разгледат други свързани с химикали въздействия върху параметрите, като растеж (например дължина) и, възможно, вътрешна скорост на увеличаване на популацията (вж. точка 44).

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНИЯ ХИМИКАЛ

Резултати от изпитването за остра токсичност (виж глава В.2 от настоящото приложение: изпитване за остра имобилизация с *Daphnia* sp.), извършен с *Daphnia magna*, може да е полезно при избиране на подходящ обхват от изпитвани концентрации при изпитвания за размножаване. Разтворимостта във вода и парното налягане на изпитвания химикал трябва да са известни и да е на разположение надежден аналитичен метод за количествено определяне на химикала в изпитваните разтвори с отчетени коефициент на аналитичния добив и граница на откриване.

Информацията за изпитвания химикал, която може да се използва при установяването на условията за изпитване, включва структурната формула, чистотата на химикала, стабилността на светлина, стабилността при условията на изпитването, рКа, Р_{ow} и резултатите от изпитването за пълна биоразградимост (вж. Глава В.4. „Определяне на пряката биологична разградимост“, и Глава В.29, Лесна биоразградимост — СО₂ в запечатани съдове) от настоящото приложение.

ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

За да бъде изпитването валидно, при контролата (контролите) следва да са изпълнени следните критерии:

- смъртността на родителските животни (женските *Daphnia*) не превишава 20 % в края на изпитването;
- средният брой живо поколение, произлязло от преживяло в края на изпитването родителско животно, е ≥ 60 .

Забележка: Същия критерий за валидност (20 %) може да бъде използвани за случайна и непреднамерена смъртност при родителите за контролите, както и за всяка от изпитваните концентрации.

▼ M7**ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА****Апаратура**

Съдовете за изпитване и другите апарати, които ще бъдат в контакт с изпитваните разтвори, трябва да бъдат направени изцяло от стъкло или друг химически инертен материал. Съдовете за изпитване обичайно са стъклени бежерови чаши.

В допълнение ще се изискват някои или всички от следните уреди:

- устройство за измерване на съдържанието на кислород (с микроелектрод или друго подходящо оборудване за измерване на разтворения кислород в проби с малък обем),
- подходящ прибор за контрол на температурата;
- рН-метър;
- оборудване за определяне на твърдостта на водата;
- оборудване за определяне на концентрацията на общ органичен въглерод (TOC) във водата, или оборудване за определяне на химична потребност от кислород (COD);
- адекватно оборудване за контрол на режима на светлина и за измерване на интензитета на светлината.

Изпитвани организми

Видът, който следва да се използва при изпитването, е *Daphnia magna* Straus⁽¹⁾.

За предпочитане е клонът да е бил идентифициран чрез генотипа му. Проучване (1) показва, че характеристиката за репродуктивността на клон А (от IRCNA във Франция) (5) последователно отговаря на критерия за валидност от средно ≥ 60 живо поколение на родителско животно, преживяло при отглеждане при условията, описани в този метод за изпитване. Обаче други клонове са допустими, при условие че културата от *Daphnia* е показала, че отговаря на критериите за валидност на изпитването.

В началото на изпитването животните следва да са на възраст по-малко от 24 часа и не трябва да са първо поколение. Те следва да са от една здрава изходна популация (т.е. такава, която не проявява признаци на стрес, като висока смъртност, наличие на мъжки и ефипиуми, забавяне в създаването на първото поколение, обезцветени животни и т.н.). Изходната популация животни трябва да се поддържа в условия на отглеждане (светлина, температура, среда, хранене и животни на единица обем), подобни на тези, които ще се използват при изпитването. Ако средата на отглеждане на *Daphnia*, която ще се използва при изпитването, е различна от обичайно използваната за отглеждане на *Daphnia*, добра практика е преди изпитването да се включи период на аклиматизация от обикновено три седмици (т.е. едно поколение), за да се избегне подлагането на стрес на родителските животни.

Среда за изпитване

Препоръчва се при това изпитване да се използва среда, която е изцяло определена. Това може да предотврати употребата на добавки (например водорасли, екстракти от почвата), които са трудни за характеризирание, и по този начин да се подобри възможността за стандартизиране между лабораториите. Създадени са подходящи за тази цел среди на Elendt M4 (6) и M7 (вж. приложение 2). Обаче са допустими и други среди (например (7) (8), при условие че бъде показано, че параметрите на културата *Daphnia* отговарят на критериите за валидност на изпитването.

⁽¹⁾ Други дафнии могат да се използват, при условие че съответно отговарят на критериите за валидност (критерият за валидност по отношение на репродуктивната способност при контролите следва да е относим към *всички* видове). Ако се използват други дафнии, те следва да бъдат ясно идентифицирани и използването им следва да е обосновано.

▼ M7

Ако се използват среди, които включват неопределени добавки, тези добавки следва да се определят ясно и в протокола от изпитването следва да се предостави информация за състава, по-специално по отношение на съдържанието на въглерод, тъй като това може да има принос по към предоставения хранителен режим. Препоръчва се да бъдат определени общият органичен въглерод (TOC) и/или химичната потребност от кислород (COD) на изходния препарат от органичната добавка и да се направи оценка на произтичащия принос към TOC и COD в приготвената среда за изпитване. Освен това се препоръчва нивата на TOC в средата (т.е. преди добавянето на водораслите) да бъде под 2 mg/l (9).

Когато се изпитват химикали, съдържащи метали, е важно да се има предвид, че свойствата на средата за изпитване (например твърдост, капацитет за хелатообразуване) могат да влияят на токсичността на изпитвания химикал. Поради тази причина е желателно средата да бъде напълно определена. Обаче до момента единствените напълно определени среди, за които се знае, че са подходящи за дългосрочно отглеждане на *Daphnia magna*, са Elendt M4 и M7. И двете среди съдържат хелатен агент EDTA. Изследванията са показали (2), че видимата токсичност на кадмия е най-общо по-ниска, когато изпитването за размножаване се извършва в среди M4 и M7, в сравнение със среди, които не съдържат EDTA. Следователно M4 и M7 не се препоръчват за изпитване на химикали, които съдържат метали, и другите среди, съдържащи известни хелатни агенти, също трябва да се избягват. За химикали, които съдържат метали може да се препоръчително да се използва алтернативна среда, като например възстановена твърда прясна вода по ASTM (9), която не съдържа EDTA. Тази комбинация от възстановена твърда прясна вода по ASTM и екстракти от водорасли (10) е подходяща за дългосрочно отглеждане на *Daphnia magna* (2).

Концентрацията на разтворения кислород следва да е над 3 mg/l в началото и по време на изпитването. Стойността на pH следва да е в обхват от 6 до 9 и обикновено следва да не варира с повече от 1,5 единици в никое от изпитванията. Препоръчва се твърдост над 140 mg/l (като CaCO₃). При изпитванията при тези нива и над тях е доказано, че репродуктивността е в съответствие с критериите за валидност (11) (12).

Разтвори за изпитване

Разтворите за изпитване с избраните концентрации обикновено се приготвят чрез разреждане на изходен разтвор. Изходните разтвори за предпочитане се приготвят без използването на каквито и да било разтворители или диспергиращи средства, ако е възможно, чрез смесване или разбъркване на изпитвания химикал в среда за изпитване с използване на механични средства, като например разклащане, разбъркване или ултрасонификация, или други подходящи методи. За предпочитане е системите за изпитване да се експонират на концентрации на изпитвания химикал, които ще се използват при изпитването, доколкото се изисква доказване на поддържането на стабилни концентрации на експозиция преди въвеждането на изпитваните организми. Ако разтварянето на изпитвания химикал във вода е трудно, трябва да бъдат следвани процедурите, описани в насоките на ОИСР за изпитване на трудни вещества (13). Използването на разтворители или диспергиращи средства следва да се избягва, но в някои случаи може да се наложи, с цел да се получи изходен разтвор за дозиране с подходяща концентрация.

Към концентрациите на изпитване следва да бъдат включени допълнително една контрола на вода за разреждане с достатъчно повторения и, ако е неизбежно, контрола на разтворител с достатъчно повторения. По време на изпитването следва да се използват само разтворители или диспергиращи средства, за които е проучено, че нямат статистически значимо влияние върху зависимата променлива, или че то е само минимално. Примери за подходящи разтворители (напр. ацетон, етанол, метанол, диметилформамид и триетиленгликол) и диспергиращи средства (напр. Stomporh RH 40, метилцелулоза 0,01 % и HCO-40) са дадени в (13). Когато се използва разтворител или диспергиращо средство, неговата крайна концентрация не следва да е по-висока от 0,1 ml/l (36) и концентрацията следва да бъде една

▼ **M7**

и съща във всички съдове за изпитване, с изключение на контролата на вода за разреждане. Независимо от това, следва да се положат всички усилия концентрацията на разтворителя да бъде поддържана на минимално равнище.

ПРОЦЕДУРА**Условия на експозиция***Продължителност*

Изпитването продължава 21 дни.

Зареждане

Родителските животни се отглеждат индивидуално, едно животно в един съд за изпитване, обикновено с 50-100 ml среда (за *Daphnia magna* може да е възможен по-малък обем, особено за по-малките дафнии например *Ceriodaphnia dubia*) за всеки съд, освен ако за изпитването е необходим проточен режим.

За да се постигнат изискванията на аналитичната процедура, използвана при определяне на концентрацията на изпитвани химикал, понякога може да са необходими по-големи обеми, въпреки че е допустимо и обединяването на повторенията за химически анализ. Ако се използват обеми, по-големи от 100 ml, може да се наложи да се увеличи дажбата, подавана на *Daphnia*, за да се гарантира достатъчна наличност на храна и съответствие с критериите за валидност.

Изпитвани животни

За полустатичните изпитвания се използват най-малко 10 животни, разделени поотделно за всяка изпитвана концентрация, и най-малко 10 животни, разделени поотделно в контролните серии.

За проточните изпитвания е установено за уместно да се използват 40 животни, разделени на четири групи от 10 животни за всяка изпитвана концентрация (1). Може да се използва по-малък брой изпитвани организми и се препоръчва минимум 20 животни за концентрация, разделени в две или повече повторения с равен брой животни (например четири повторения, като всяко съдържа пет дафнии). Следва да се отбележи, че за изпитвания, при които животните са държани в групи, няма да бъде възможно да се изключи никакво поколение от статистическия анализ, ако е получена непреднамерена/случайна смъртност при родителите, когато размножаването е започнало, и следователно в тези случаи репродуктивната способност следва да се изразява като общ брой живо поколение, произлязло от родител, който е бил наличен в началото на изпитването.

Третиранията следва да се разпределят към съдовете за изпитването на случаен принцип и всяко последващо обработване на съдовете за изпитване следва да бъде извършено на случаен принцип. Неизпълнението на тези действия може да доведе до изместване, което може да се изтълкува погрешно като въздействие от концентрацията. По-специално, ако опитните единици се обработват по реда на третирането или концентрацията, тогава някой ефект, относим към времето, като умората на оператора или други грешки, може да доведе до по-големи въздействия при по-високи концентрации. Нещо повече, ако е вероятно резултатите от изпитването да са повлияни от първоначално условие или от условие на околната среда при изпитването, такива като местонахождение в лабораторията, следва да се помисли за спиране на изпитването.

Хранене

При полустатичните изпитвания храненето за предпочитане се прави дневно, но поне три пъти на седмица (т.е. съответстващи на подмяната на средата). Евентуалното разреждане на концентрациите на експозиция от хранителна добавка следва да се вземе предвид и да се избягва в максимално възможна степен с добре концентрирани суспензии водорасли. Отклоненията от това (например за проточните изпитвания) следва да бъдат протоколирани.

По време на изпитването хранителният режим на родителските животни за предпочитане са живи клетки от морски водорасли от едно или повече от следните: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (предходно *Scenedesmus capricornutum*) и *Desmodesmus subspicatus* (предходно *Scenedesmus subspicatus*). Хранителният режим, който се прилага, следва да се основава на количеството органичен въглерод (C), осигурен за всяко родителско животно. Проучванията (14) показват, че за *Daphnia magna* нива на дажбата между 0,1 и 0,2 mg C/*Daphnia*/ден са достатъчни за получаването на изисквания брой живо поколение, за да се покрият критериите за валидност на изпитването. Дажбата може да се подава или при постоянна

▼ **M7**

скорост по време на изпитването, или, ако е желателно, може да се използва по-ниска скорост в началото на изпитването, която може да се повиши по време на извършването на изпитването, за да се вземе предвид растежът на родителските животни. В този случай дажбата все още остава в препоръчания обхват от 0,1 — 0,2 mg *C/Daphnia*/ден по всяко време.

Ако за да се поддържа изискваното ниво на дажба (т.е. за удобство, тъй като измерването на въглерода изисква време) трябва да се използват заместващи измерители, такива като брой на клетките от морски водорасли или светлинна абсорбция, всяка лаборатория трябва да изготви собствена номограма, която свързва заместващия измерител със съдържанието на въглерод в културата от водорасли (вж. допълнение 3 за съвети за изготвянето на номограма). Номограмите следва да се проверяват поне веднъж годишно и по-често, ако условията за отглеждане на морските водорасли са се променили. Установено е, че светлинната абсорбция е по-добър заместител за съдържанието на въглерод, отколкото броят на клетките (15).

За да се минимизира обемът на средата с отглеждани водорасли, прехвърляна в съдовете за изпитване, *Daphnia* следва да се хранят с концентрирана суспензия от водорасли. Концентрацията на водорасли може да се постигне чрез центрофугиране, последвано от повторно суспендиране в средата за отглеждане на *Daphnia*.

Светлина

16 часа светлина при интензитет, непревишаващ $15\text{--}20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, измерена на повърхността на водата на съда. За уреди за измерване на светлината, калибрирани в lux, еквивалентният диапазон от 1 000 — 1 500 lux за студена бяла светлина съответства приблизително на препоръчания интензитет на светлината от $15\text{--}20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Температура

Температурата на средата за изпитване е в интервал от 18-22°C. Обаче за всяко отделно изпитване температурата следва да не варира, ако е възможно, с повече от 2 °C в рамките на тези ограничения (например 18-20, 19-21 или 20-22°C) като интервал за деня. Може да е подходящо използването на допълнителни съдове за изпитване за целите на следенето на температурата.

Аериране

По време на изпитването съдовете следва да не се проветряват.

Планиране на изпитването*Изпитване за определяне на обхват*

Когато е необходимо, се провежда изпитване за определяне на обхвата, например за пет концентрации на изпитвания химикал и две повторения за всяко третиране и контрола. Допълнителна информация за остра токсичност за *Daphnia* и/или други водни организми, получена от изпитвания с аналогични химикали или от литературата, може също да бъде полезна при вземането на решение за обхвата на концентрациите, които да се използват при изпитването за определяне на обхвата.

Продължителността на изпитването за определяне на обхвата е 21 дни или с продължителност, която е достатъчна да се направят надеждни прогнози за нивата на въздействие. В края на изпитването се оценява размножаването на *Daphnia*. Броят на родителите и срещането на поколение трябва да бъдат записани.

Окончателно изпитване

Обикновено следва да са налични поне пет изпитвани концентрации, обграждащи ефективна концентрация (напр. EC_x) и подредени в геометрична прогресия с частно, което за предпочитане не превишава 3,2. Трябва да се използва подходящ брой повторения за всяка изпитвана концентрация т (вж. точки 24-25). Трябва да се представи обосновка, ако са използвани по-малко от пет концентрации. Следва да не се изпитват химикали над тяхната граница

▼ **M7**

на разтворимост в изпитваната среда. Преди провеждане на опита е препоръчително да се разгледа статистическата мощност по плана за изпитването и използването на подходящи статистически методи (4). При определяне на обхвата от концентрации следва да се взема предвид следното:

- i) когато се прави оценка на EC_x за въздействие върху размножаването, се препоръчва да се използват концентрации, достатъчни за определяне на EC_x с подходяща доверителна вероятност. За предпочитане е използваните концентрации за изпитване да обграждат оценката за EC_x , така че EC_x да се получава чрез интерполация, а не чрез екстраполация. Преимущество за следващия статистически анализ е да има повече изпитвани концентрации (напр. 10) и по-малко повторения на всяка концентрация (напр. 5, като по този начин общият брой на съдовете остава постоянен) и с 10 контроли.
- ii) При оценяването на LOEC и/или NOEC най-ниската изпитвана концентрация трябва да е достатъчно ниска, така че репродуктивната способност при тази концентрация да не е значимо по-ниска от тази при контролата. Ако случаят не е такъв, изпитването трябва да се повтори с намалена най-ниска концентрация.
- iii) При оценяването на LOEC и/или NOEC най-високата изпитвана концентрация трябва да е достатъчно висока, така че репродуктивната способност при тази концентрация да е значимо по-ниска от тази при контролата. Ако случаят не е такъв, изпитването трябва да се повтори с повишена най-висока концентрация, освен ако максималната изисквана концентрация на изпитване при изпитвания за хронични ефекти (т.е., 10 mg/l) е използвана като най-високата концентрация на изпитване при първоначалното изпитване.

Ако при изпитване за определяне на обхвата не се наблюдават ефекти при най-високата концентрация (напр. при 10 mg/l), или когато изпитваният химикал е много вероятно да проявява слаба/нулева токсичност въз основа на отсъствието на токсичност за други организми, и/или малко/нулево поглъщане, изпитването за размножаване може да се извършва като гранично изпитване с пределна концентрация за изпитване например 10 mg/l и контрола. Както за групите за третиране, така и за контролните групи трябва да бъдат използвани по десет повторения. Когато е възможно да е необходимо гранично изпитване при проточна система, може да е достатъчен по-малък брой повторения. Гранично изпитване ще предостави възможност да се демонстрира, че няма статистически значимо въздействие при пределната концентрация, но ако бъдат отчетени статистически значими въздействия, обикновено ще се изисква цялостно изпитване.

Контроли

Допълнително към изпитваната серия следва да се стартира една серия с контрола на средата за изпитване и, ако е относимо, също и една серия с контрола, съдържаща разтворителя или диспергиращото средство. Когато се използва такава серия, концентрацията на разтворителя или на диспергиращото вещество следва да е същата като използваната в съдовете, съдържащи изпитвания химикал. Следва да се използва подходящ брой повторения (вж. точки 23-24).

Най-общо, при добре проведено изпитване коефициентът на вариация около средния брой живо поколение, произлязло от едно родителско животно в контролата(ите), следва да бъде ≤ 25 и това следва да се протоколира при планиране на изпитвания, при които се използват самостоятелно отглеждани животни.

Обновяване на средата за изпитване

Честотата на обновяването на средата зависи от устойчивостта на изпитвания химикал, но следва да бъде поне три пъти на седмица. Ако от предварителните изпитвания за стабилност (вж. точка 7) концентрацията на изпитвания химикал не е стабилна (т.е. се намира извън обхвата от 80 — 120 % от номиналната или спада под 80 % от измерената първоначална концентрация) през максималния период на обновяване (т.е. 3 дни), следва да се разгледа възможност за по-често обновяване на средата или за използване на проточно изпитване.

▼ M7

Когато средата се обновява при полустатичните изпитвания, се подготвя втора серия от съдове за изпитване и родителските животни се прехвърлят в тях, например чрез стъклена пипета с подходящ диаметър. Количеството прехвърлена среда с *Daphnia* следва да се сведе до минимум.

Наблюдения

Резултатите от наблюденията, направени по време на изпитването, се записват в таблици (вж. примерите в допълнения 4 и 5). Ако се изискват други измервания (вж. точка 44), могат да се изискват допълнителни наблюдения.

Поколение

За да не консумира храната, предназначена за родителското животно, предпочита се поколението, произлязло от всяко родителско животно, да се отстранява и всекидневно да се преброява, считано от появяването на първото поколение. За целите на този метод за изпитване е необходимо да се преброява само живото поколение, но наличието на недоразвити яйца или мъртво поколение следва да бъде протоколирано.

Смъртност

За предпочитане е смъртността между родителските животни да се записва всеки ден, или най-малко с честота, равна на честотата на преброяване на поколението.

Други параметри

Въпреки че този метод за изпитване принципно е планиран да оценява въздействието върху репродуктивната способност, е възможно да се определят количествено в достатъчна степен и други въздействия, за да се позволи статистически анализ. Репродуктивната способност, изразена на едно преживяло родителско животно, т.е. броят живо поколение, произлязло от едно преживяло родителско животно по време на изпитването, може да се запише. Това може да се сравни с основната зависима променлива (репродуктивната способност, изразена на едно преживяло родителско животно в началото на изпитването, което не е умъртвено непреднамерено или случайно по време на изпитването). Ако се появи смъртност при родителите в подложени на експозиция повторения, следва да се разгледа дали смъртността следва модел концентрация-отклик, например ако е налице значима регресия при отклика спрямо концентрацията на изпитвания химикал с положителен наклон (за това може да се използва статистически тест, подобен на трендовия тест на Кокрън-Армитидж). Ако смъртността не следва модел концентрация-отклик, тогава тези повторения с родителска смъртност следва да бъдат изключени от анализа на резултата от изпитването. Ако смъртността следва модел концентрация-отклик, смъртността при родителите следва да бъде представена като ефект на изпитвания химикал и повторенията не следва да бъдат изключени от анализа на резултата от изпитването. Особено желателно е измерване на растежа, тъй като чрез него се набира информация за възможни сублетални въздействия, която може да е полезна, в допълнение към измерването само на репродуктивността; препоръчва се в края на изпитването да се измери дължината на родителските животни (т.е. дължината на тялото, като се изключи апикалният шип). Други параметри, които могат да се измерват или изчисляват, включват време за получаване на първото поколение (и следващите), брой и размер на животните от поколението, на животно, брой на неразвитото поколение, наличие на мъжки новородени (ОИСП, 2008 г.) или ефипиуми и, възможно, вътрешна скорост на нарастване на популацията (вж. допълнение 1 за определение и допълнение 7 за определяне на пола на новородените).

Честота на аналитичните определяния и измервания

Поне веднъж в седмицата следва да се измерват стойностите на концентрацията на кислород, температурата, твърдостта и рН, в прясна и стара среда, в контролата(ите) и при най-високата концентрация на изпитвания химикал.

По време на изпитването концентрациите на изпитвания химикал се определят на равни интервали.

При полустатичните изпитвания, където концентрацията на изпитвания химикал се очаква да остане в рамките на $\pm 20\%$ от номиналната (т.е. в обхвата 80-120% — вж. точки 6, 7 и 39), се препоръчва да се анализират като минимум, най-високата и най-ниската концентрации на изпитване —

▼ **M7**

прясно приготвени и при обновяването — веднъж през първата седмица на изпитването (т.е. прави се анализ на проба от същия разтвор — прясно приготвен и при обновяването). След това тези определяния се повтарят на интервали от поне една седмица.

За изпитвания, при които концентрацията на изпитвания химикал не се очаква да остане в рамките на $\pm 20\%$ от номиналната, е необходимо да се анализират всички концентрации на изпитване, прясно приготвени и при обновяването. Обаче при изпитванията, при които измерената начална концентрация на изпитвания химикал не е в рамките на $\pm 20\%$ от номиналната, но за които може да се предоставят достатъчно доказателства, показващи, че началните концентрации са повторими и стабилни (т.е., в диапазона 80—120 % от началната концентрация), химичните определяния могат да бъдат намалени през седмица 2 и 3 от изпитването до най-високата и най-ниската изпитвана концентрация. Във всички случаи определянето на концентрациите на изпитвания химикал преди обновяването е необходимо да се извършва само за един съд с повторение, за всяка изпитвана концентрация.

Ако се използва проточно изпитване, подходящ е режим за взимане на проби, подобен на описания при полустатичните изпитвания, но измерванията на „старите“ разтвори в този случай не са приложими. Препоръчително е обаче да се увеличи броят на вземането на проби през първата седмица (например три набора от измервания), за да се гарантира, че изпитваните концентрации остават стабилни. При тези видове изпитване дебитът на разреждателя и изпитвания химикал трябва да се проверяват ежедневно.

Ако има доказателство, че през цялото време на изпитването концентрацията на химикала, който се изпитва, е била задоволително поддържана в рамките на $\pm 20\%$ от номиналната или измерената първоначална концентрация, резултатите могат да бъдат базирани на номиналната или на измерената първоначална стойност. Ако отклонението от номиналната или измерената първоначална концентрация е по-голямо от $\pm 20\%$ процента, резултатите следва да се изразяват чрез среднопотеглената във времето стойност (вж. указания за изчислението в допълнение 6).

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Обработка на резултатите**

Целта на настоящото изпитване е да се определи въздействието на изпитвания химикал върху репродуктивната способност. Общият брой живо поколение за едно родителско животно следва да се изчислява за всеки съд за изпитване (т.е. повторение). Освен това репродуктивността може да се изчисли въз основа на произвеждането на живо поколение от преживелия родителски организъм. Въпреки това най-относимата от екологична гледна точка зависима променлива е общият брой живо поколение, произлязло от едно родителско животно, което не е умъртвено случайно⁽¹⁾ или непреднамерено⁽²⁾ по време на изпитването. Ако родителското животно умре случайно или непреднамерено по време на изпитването, или се окаже мъжки индивид, повторението се изключва от анализа. Анализът тогава ще се основава на намален брой повторения. Ако се появи смъртност при родителите в подложени на експозиция повторения, следва да се разгледа дали смъртността следва модел концентрация-отклик, например ако е налице значима регресия при отклика спрямо концентрацията на изпитвания химикал с положителен наклон (за това може да се използва статистически тест, подобен на трендовия тест на Кокрън-Армитидж). Ако смъртността не следва модел концентрация-отклик, тогава тези повторения с родителска смъртност следва да бъдат изключени от анализа на резултата от изпитването. Ако смъртността следва модел концентрация-отклик, смъртността при родителите следва да бъде представена като ефект на изпитвания химикал и повторенията не следва да бъдат изключени от анализа на резултата от изпитването.

Като обобщение, когато за изразяване на ефектите се използват LOEC и NOEC или EC_x, препоръчително е да се изчисли ефектът върху репродуктивността, като се използват и двете зависими променливи, посочени по-горе, а именно

⁽¹⁾ Случайна смъртност: смъртност, която не е свързана с химикал, и която е причинена от случайно въздействие (т.е. известна причина)

⁽²⁾ Непреднамерена смъртност: смъртност, която не е свързана с химикал, и която е с неизвестна причина

▼ M7

— като общия брой живо поколение, произлязло от едно родителско животно, което не е умряло случайно или непреднамерено по време на изпитването, и;

— като броя на живото поколение, произлязло от едно преживяло родителско животно;

и след това като окончателен резултат да се използва най-ниската стойност на LOEC и NOEC или EC_x , изчислена с помощта на тези две зависими променливи.

Преди прилагането на статистическия анализ, например ANOVA процедури, сравнение на третираната с контролите чрез t-тест на Стюдънт, тест на Дънет, тест на Уилямс или тест на Йонкхере-Терпстра със стъпка назад, се препоръчва да се вземе предвид преобразуване на данните, ако това е необходимо за изпълнение на изискванията на определения статистически тест. Като непараметрични алтернативи може да се обмисли тест на Дън или тест на Ман-Уитни. За индивидуалните средни от третиране се изчисляват доверителни интервали от 95 %.

Броят на преживелите родителски животни в нетретираните контроли е критерий за валидност и трябва да бъде документиран и протоколиран. Също така всички други вредни въздействия, например необичайно поведение и токсикологично значими констатации, следва да се протоколират също и в окончателния протокол.

EC_x

Стойностите на EC_x , включително свързаните с тях долни и горни доверителни граници, се изчисляват с помощта на подходящи статистически методи (например логистична функция или функция на Вейбул, метод на Спирмън-Карбър с изключване на данни, или обикновена интерполация). За изчисляване на EC_{10} , EC_{50} или всяка друга стойност EC_x , пълният набор от данни следва да бъде подложен на регресионен анализ.

NOEC/LOEC

Ако статистическия анализ е предназначен за определяне на NOEC/LOEC, трябва да се използват подходящи статистически методи съгласно документ на ОИСП № 54 „Съвременни подходи за статистически анализ на данни за екоотоксичност: ръководство за прилагане“ (4). По принцип неблагоприятните въздействия на изпитвания химикал в сравнение с контролата се проучват чрез тестване на едностранна хипотеза при $p \leq 0,05$.

Нормалното разпределение и хомогенността на дисперсията могат да бъдат тествани с помощта на подходящ статистически тест, напр. съответно тест на Шапиро-Уилк и тест на Левин ($p \leq 0,05$). Може да бъде извършен еднофакторен ANOVA с последващи множествени сравнения. За изчисляване дали са налице статистически значими разлики ($p \leq 0,05$) между контролите и различните концентрации на изпитвания химикал могат да се използват множествени сравнения (например тест на Дънет) или трендови тестове със стъпка назад (напр. тест на Уилямс или тест на Йонкхере-Терпстра със стъпка назад) (избор на препоръчителния тест в съответствие с документ № 54 на ОИСП (4)). В противен случай за определяне на NOEC и LOEC могат да се използват непараметрични методи (напр. U-тест на Бонферони по Холм или трендов тест на Йонкхере-Терпстра).

Гранично изпитване

Ако е извършено гранично изпитване (сравнение на контрола и само на едно третиране) и са изпълнени критериите за използване на параметрични тестови процедури (нормалност, хомогенност), метричните отклици могат да бъдат оценени чрез тест на Стюдънт (t-тест). Ако тези изисквания не са изпълнени, може да се използва t-тест за нееднаква дисперсия (t-тест на Уелч) или непараметричен тест, напр. U-тест на Ман-Уитни.

За установяване на значими разлики между контролите (контрола и контрола на разтворител или на диспергиращо средство), повторенията на всяка контрола могат да се изпитват, както е описано при граничното изпитване. Ако при тези изпитвания не бъдат установени значими разлики, всички повторения на контроли и контроли на разтворител могат да бъдат обединени. В противен случай всички третираня следва да бъдат сравнявани с контролата на разтворител.

▼ **M7****Протокол от изпитването**

Протоколът от изпитването трябва да включва следното:

Изпитван химикал:

- физическа природа и относими физични и химични свойства;
- данни за химичната идентификация, включително чистота.

Изпитван вид:

- клон (да се уточни, ако е определен геномът му), доставчик или източник (ако е известен) и прилаганите условия за отглеждане. Ако се използват вид, различен от *Daphnia magna*, това следва да се протоколира и обоснове.

Условия на изпитването:

- използваната при изпитването процедура (т.е. полустатична или проточна, обем, зареждане в брой *Daphnia* за литър);
- период на излагане на светлина и интензитет на светлината;
- план на изпитването (напр. брой повторения, брой родители в едно повторение);
- подробности за използваната среда за отглеждане;
- ако са използвани, добавки от органични материали, включително състав, източник, метод на приготвяне, ТОС/COD на изходния препарат, оценка на получената стойност на ТОС/COD в средата за изпитване;
- подробна информация за храненето, включително количеството (в mg C/*daphnia*/ден) и график (например вида на храната(ите), включително характерното наименование (вид) на водораслите и, ако са известни, шамът, условията на отглеждане);
- метод на приготвяне на изходните разтвори и честотата на обновяване (ако се използват разтворител или диспергиращо средство, те следва да се посочат, както и тяхната концентрация).

Резултати:

- резултатите от всички предварителни проучвания върху стабилността на изпитвания химикал;
- номиналните изпитвани концентрации и резултатите от всички анализи за определяне на концентрацията на изпитвания химикал в съдовете за изпитване (вж. примерни таблици с данни в допълнение 5); следва да се протоколират също коефициентът на аналитичния добив на метода и границата на определяне;
- качество на водата в съдовете за изпитване (т.е. рН, температура и концентрация на разтворения кислород и ТОС и/или COD, и твърдост, където е необходимо) (вж. примерна таблица с данни в допълнение 4);
- цялостен запис за получен брой живо поколение по време на изпитването от всяко родителско животно (вж. примерна таблица с данни в допълнение 4);
- брой на мъртвите сред родителските животни и ден на настъпване на смъртта (вж. примерна таблица с данни в допълнение 4);
- коефициент на вариация за репродуктивната способност в контролите (основан на общия брой живо поколение за родителско животно, преживяло в края на изпитването);
- графика на общия брой живо поколение за родителско животно във всяко повторение, с изключение на всички родителски животни, при които е възможно смъртта да е настъпила случайно или непреднамерено по време на изпитването, спрямо концентрацията на изпитвания химикал;

▼ M7

- по целесъобразност, графика на общия брой живо поколение, произлязло от преживяло родителско животно във всяко повторение, спрямо концентрацията на изпитвания химикал
- когато е целесъобразно, най-ниска концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC) за репродуктивността, включително описание на използваните статистически процедури и указание за това, каква големина на въздействие може да се очаква да бъде открита (за осигуряване на това може да се извърши анализ на мощността преди началото на опита), и концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC) върху репродуктивността; информация за това коя зависи променлива е използвана за изчисляване на стойностите на LOEC и NOEC (като общ брой живо поколение за родителско животно, което не е умъртвено случайно или непреднамерено по време на изпитването или като общ брой живо поколение за преживяло родителско животно), където е уместно, следва също да бъдат протоколирани LOEC или NOEC за смъртността на родителските животни;
- където е подходящо, стойността EC_x за репродуктивността и доверителни интервали (напр. 90 % или 95 %) и графика на изгладения модел, използван за нейното изчисляване, наклон на кривата концентрация-отклик, и нейната стандартна грешка;
- други наблюдавани биологически ефекти или измервания: протоколиране на всички други биологични ефекти, които са били наблюдавани или измерени (например растеж на родителски животни), включително и подходяща обосновка;
- обяснение за всички отклонения от метода за изпитване.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.
- (2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.
- (3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.
- (4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.
- (5) Baird, D.J., *et al.* (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotox. and Environ. Safety*, 21, 257-265.
- (6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.
- (7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods
- (8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 775-782.
- (9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 — 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA
- (10) Baird, D.J., *et al.* (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.

▼ M7

- (11) Parkhurst, B.R., J.L Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1-8.
- (12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2): 185-196.
- (13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.
- (14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058.
- (15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

▼ M7

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

За целите на настоящия метод за изпитване са използвани следните определения:

Случайна смъртност: смъртност, която не е свързана с химикал, и която е причинена от случайно въздействие (т.е. известна причина).

Химикал: вещество или смес.

ЕСх: концентрацията на изпитвания химикал, разтворен във вода, в резултат от която репродуктивността на *Daphnia magna* намалява с x % по време на определен период на експозиция.

Непреднамерена смъртност: смъртност, която не е свързана с химикал, и която е с неизвестна причина.

Вътрешна скорост на нарастване на популацията: мярка за растеж на популацията, която интегрира репродуктивната способност и специфичната за възрастта смъртност (1) (2) (3). При популации в стационарно състояние тя е нула. При нарастващи популации е положителна, а при намаляващи популации е отрицателна. Последната очевидно не води до устойчивост и накрая води до изчезване.

Граница на откриване: най-ниската концентрация, която може да се открие, но не може да се определи количествено.

Граница на определяне: най-ниската концентрация, която може да се измери количествено.

Най-ниска концентрация, при която се наблюдава ефект (ЛОЕС): най-ниската изпитвана концентрация, при която за химикала се наблюдава статистически значимо въздействие върху репродуктивната способност и смъртността на родителските животни (при $p < 0,05$) в сравнение с контролната, в рамките на дадено време на експозиция. Независимо от това, всички изпитвани концентрации над ЛОЕС трябва да имат вредно въздействие, равно или по-голямо от наблюдаваното при ЛОЕС. Когато тези две условия не могат да бъдат удовлетворени, трябва да се даде цялостно обяснение за това как е била избрана ЛОЕС (и следователно NOEC).

Смъртност: дадено животно се записва като мъртво, когато е неподвижно, т.е. когато не е способно да плува, или ако не се наблюдава движение на придатъците и постабдомена в рамките на 15-секундно леко разклащане на съда за изпитване. (Ако се използва друга дефиниция, това трябва да се протоколира, заедно с референтните данни за нея).

Концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC): това е изпитваната концентрация непосредствено преди ЛОЕС, която, при сравнение с контролата, няма статистически значимо въздействие ($p < 0,05$), в рамките на дадено време на експозиция.

Поколение: младите *Daphnia*, произлезли от родителските животни по време на изпитването.

Родителски животни: онези женски *Daphnia*, които присъстват в началото на изпитването, и чиято репродуктивна способност е обект на проучването.

Репродуктивната способност: броят живо поколение, произлязло от родителски животни в рамките на периода на изпитване

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

Литература

- (1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

▼ M7

- (2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.
- (3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

▼ **M7**

Допълнение 2

**ПРИГОТВЯНЕ НА НАПЪЛНО ОПРЕДЕЛЕНА СРЕДА НА ELENDDT
M7 И M4****Аклиматизация към средите на Elendt M7 и M4**

Някои лаборатории срещат трудности при директното прехвърляне на *Daphnia* към среди M4 (I) и M7. Независимо от това са постигнати някои успехи при постепенната аклиматизация, т.е. преместване от собствена среда към 30 % Elendt, след това към 60 % Elendt и след това към 100 % Elendt. Може да се наложи периодите на аклиматизация да бъдат дълги по един месец.

Приготвяне*Микроелементи*

Първо, във вода с подходяща чистота, т.е. дейонизирана, дестилирана или с обратна осмоза, се приготвят отделени изходни разтвори (I) от индивидуални микроелементи. От тези различни изходни разтвори (I) се приготвя втори отделен изходен разтвор (II), който съдържа всички микроелементи (комбиниран разтвор), т.е.:

Изходен разтвор (изходни разтвори I (едно вещество))	Количество, добавено към вода	Концентрация (по отношение на средата M4)	За приготвяне на комбинирания изходен разтвор II се добавя следното количество изходен разтвор I към вода	
			ml/l	
	mg/l		M 4	M 7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000-кратно	1,0	0,25
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	7 210	20 000-кратно	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-кратно	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-кратно	1,0	0,25
SrCl ₂ · 6 H ₂ O	3 040	20 000-кратно	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-кратно	1,0	0,25
Mo Na ₂ O ₄ · 2 H ₂ O	1 260	20 000-кратно	1,0	0,25
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	335	20 000-кратно	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000-кратно	1,0	1,0
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	200	20 000-кратно	1,0	1,0
KI	65	20 000-кратно	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000-кратно	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000-кратно	1,0	1,0
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	5 000	2 000-кратно	—	—
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	1 991	2 000-кратно	—	—

И при разтвор на Na₂EDTA, и при разтвор на FeSO₄ разтворите се приготвят отделно, изливат се заедно и незабавно се автоклавираат. Това дава:

Fe-EDTA разтвор		1 000-кратно	20,0	5,0
-----------------	--	--------------	------	-----

▼ **M7***M4 и M7 среда*

Средите M4 и M7 се приготвят чрез използване на изходен разтвор II, хранителните макроелементи и витамини, както следва:

	Количество, добавено към вода	Концентрация (по отношение на средата M4)	Количество изходен разтвор, прибавено за приготвяне на средата	
			M 4	M 7
	mg/l		ml/l	
Изходен разтвор II (комбинирани микроелементи)		20-кратно	50	50
Изходни разтвори на хранителни макроелементи (едно вещество)				
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	293 800	1 000-кратно	1,0	1,0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246 600	2 000-кратно	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-кратно	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000-кратно	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O	50 000	5 000-кратно	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000-кратно	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000-кратно	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000-кратно	0,1	0,1
Комбиниран изходен разтвор на витамини	—	10 000-кратно	0,1	0,1

Комбинираният изходен разтвор на витамини е приготвен чрез добавяне на 3 витамина към 1 литър вода, както е показано по-долу:

	mg/l			
Тиаминхидрохлорид	750	10 000-кратно		
Цианокобаламин (B ₁₂)	10	10 000-кратно		
Биотин	7,5	10 000-кратно		

Комбинираният изходен разтвор на витамини се съхранява замразен на малки аликвотни части. Витамините се добавят към средата малко преди употреба.

N.B.: За да се избегне утаяването на соли, когато се приготвя цялата среда, се прибавят аликвотните части от изходните разтвори към около 500 — 800 ml дейонизирана вода, и след това се допълва до 1 литър.

N.N.B. Първото публикуване на среда M4 може да се намери в Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.

▼ **M7**

Допълнение 3

**АНАЛИЗ НА ОБЩИЯ ОРГАНИЧЕН ВЪГЛЕРОД (ТОС) И
СЪЗДАВАНЕ НА НОМОГРАМА ЗА СЪДЪРЖАНИЕ НА ТОС В
ХРАНАТА ОТ МОРСКИ ВОДОРАСЛИ**

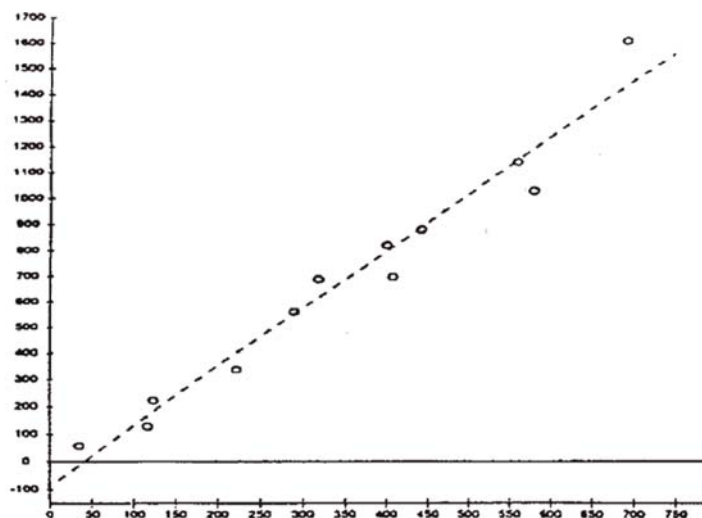
Приема се, че съдържанието на въглерод в храната от морски водорасли обикновено не се измерва директно, а от корелации (т.е. номограми) с измервания заместители, като брой на клетките морски водорасли, или абсорбция на светлина.

ТОС следва се измерва чрез високотемпературно окисляване, а не чрез методи с UV или персулфати. (За насоки вж.: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

За създаване на номограмата водораслите следва да се отделят от средата на растеж чрез центрофугиране, последвано ресуспендиране в дестилирана вода. Измерват се параметрите заместители и концентрацията на ТОС във всяка проби в три повторения. Празните проби с дестилираната вода следва да се анализират и ТОС концентрацията се изважда от ТОС концентрацията на пробите от водорасли.

Номограмите следва да са линейни в изисквания обхват от концентрации на въглерод. По-долу са показани примери.

N.B. Те следва да не се използват за конверсия; необходимо е лабораториите да приготвят свои собствени номограми.



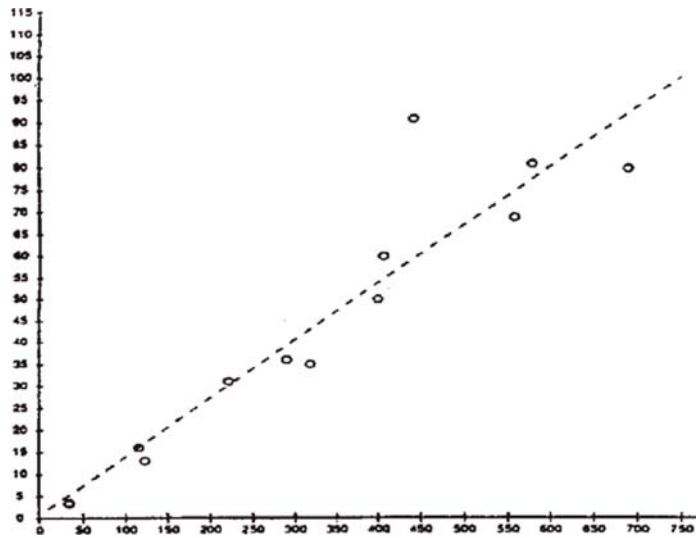
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Регресия на mg/l сухо тегло спрямо mg C/l. Данни от концентрирани суспензии на клетки от полунепрекъснато култивиране, ресуспендирани в дестилирана вода.

ос „x“: mg C/l концентрирана храна от водорасли

ос „y“: mg/l сухо тегло концентрирана храна от водорасли

Коефициент на корекция – 0,980

▼ M7

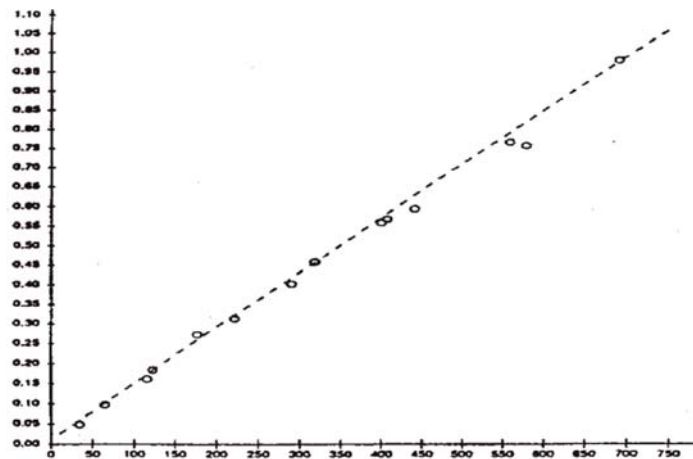
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Регресия на броя на клетките спрямо mg C/l. Данни от концентрирани суспензии на клетки от полунепрекъснато култивиране, ресуспендирани в дестилирана вода.

ос „x“: mg C/l концентрирана храна от водорасли

ос „y“: mg C/l концентрирана храна от водорасли

Коефициент на корекция – 0,926



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Регресия на абсорбция спрямо mg C/l (дължина 1 cm). Данни от концентрирани суспензии на клетки от полунепрекъснато култивиране, ресуспендирани в дестилирана вода.

ос „x“: mg C/l концентрирана храна от водорасли

ос „y“: Абсорбция при 440 nm на 1/10 разреждане на концентрирана храна от водорасли

Коефициент на корекция – 0,998

ПРИМЕРНА ТАБЛИЦА ЗА ЗАПИСВАНЕ НА ОБНОВЯВАНЕ НА СРЕДА, ДАННИ ОТ ФИЗИЧЕН/ХИМИЧЕН МОНИТОРИНГ, ХРАНЕНЕ, РЕПРОДУКТИВНОСТ НА ДАРНИА И СМЪРТНОСТ ПРИ РОДИТЕЛСКИТЕ ЖИВОТНИ

Опит №:	Дата на началото:					Клон:					Среда:					Вид храна					Изпитван химикал:					Номинална концентрация:			
	Ден	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21						
Обновяване на средата (отметка)																													
pH (*)																												нова	
																												стара	
O ₂ (mg/l) (*)																												нова	
																												стара	
Темп. (°C) (*)																												нова	
																												стара	
Предоставена храна (отметка)																													
Брой живо поколение (**)																													Общо
Съд 1																													
2																													
3																													
4																													
5																													

▼ M7

Опит №:	Дата на началото:					Клон:					Среда:					Вид храна					Изпитван химикал:					Номинална концентрация:	
	Ден	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21				
6																											
7																											
8																											
9																											
10																											
																									Общо		
Кумулативна смъртност на родителски животни (***)																											

(*) Посочва се кой съд е използван за опита

(**) Записва се неразвитото поколение като „АВ“ в съответната клетка

(***) Записва се смъртността на всякакви родителски животни като „М“ в съответната клетка

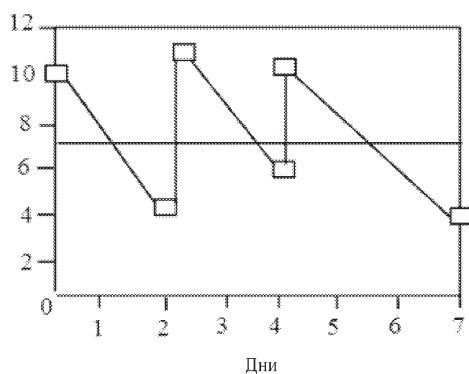
▼ **M7**

Допълнение 6

ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА СРЕДНО ПРЕТЕГЛЕНА ВЪВ ВРЕМЕТО СТОЙНОСТ**Средно претеглена във времето стойност**

Като се има предвид, че концентрацията на изпитвания химикал може да намалява в периода между обновяванията на средата, необходимо е да се прецени коя концентрация от обхвата на изпробваните концентрации върху родител *Daphnia* да се избере като представителна. Изборът следва да се основава на биологически и статистически преценки. Например, ако се смята, че репродуктивността е повлияна най-вече от изпробваната върхова концентрация, тогава се използва максималната концентрация. Обаче ако се смята, че акумулираният или по-дългосрочният ефект на токсичния химикал е по-важен, тогава е по-подходяща средна концентрация. В този случай подходящата средна величина, която се използва, е средно претеглената във времето стойност на концентрацията, тъй като с това се взема предвид варирането на моментната концентрация във времето.

Фигура 1

Пример за средно претеглената във времето стойност

Фигура 1 показва пример за (опростено) изпитване, което продължава седем дни, с обновяване на средата в дни 0, 2 и 4.

- Тънката зигзагообразна линия показва концентрацията във всяка времева точка. За намаляването на концентрацията се допуска, че следва процес на експоненциално намаляване.
- Изобразените 6 точки представляват наблюдаваните концентрации, които са измерени в началото и в края на всеки период на обновяване.
- Дебелата линия показва разположението на средно претеглената във времето стойност.

Средно претеглената във времето стойност се изчислява така, че зоната под средно претеглената във времето стойност да е равна на зоната под концентрационната крива. Изчисляването за по-горе посочения пример е посочено в таблица 1.

Таблица 1

Изчисляване на средно претеглената във времето стойност

Обновяване №	Дни	Конц 0	Конц 1	Ln(Конц 0)	Ln(Конц 1)	Площ
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781

▼ M7

Обновяване №	Дни	Конц 0	Конц 1	Ln(Конц 0)	Ln(Конц 1)	Площ
Общ брой дни:	7					Обща площ: 50,092
						Средно претеглена във времето стойност: 7,156

„Дни“ е броят на дните в периода на обновяване

„Конц 0“ е измерената концентрация в началото на всеки период на обновяване

„Конц 1“ е измерената концентрация в края на всеки период на обновяване

„Ln(Конц 0)“ е естественият логаритъм на Конц 0

„Ln(Конц 1)“ е естественият логаритъм на Конц 1

„Площ“ е площта под експоненциалната крива за всеки период на обновяване. Изчислява се чрез:

$$\text{Площ} = \frac{\text{Конц 0} - \text{Конц 1}}{\text{Ln}(\text{Конц 0}) - \text{Ln}(\text{Конц 1})} \times \text{Дни}$$

Средно претеглената във времето стойност е *общата площ*, разделена на *общия брой дни*.

Разбира се, за изпитването за репродуктивност на *Daphnia*, таблицата би трябвало да се разшири до 21 дни.

Ясно е, че когато се извършват наблюдения само в началото и в края на всеки период на обновяване, е невъзможно да се потвърди, че процесът на намаляване е всъщност експоненциален. Различна крива би довела до различно изчисление за графата „Площ“. Обаче експоненциалният процес на намаляване не е неправдоподобен и вероятно е най-добрата крива, която да се използва при отсъствието на друга информация.

Независимо от това се изисква предпазливост, ако химическият анализ не доведе до намиране на някакво количество химикал в края на периода на обновяване. Ако не е възможно да се оцени колко бързо химикалът е отстранен от разтвора, е невъзможно да се получи реалистична площ под кривата и следователно е невъзможно да се постигне разумна среднопретеглена във времето стойност.

▼ M7

Допълнение 7

НАСОКИ ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ПОЛА НА НОВОРОДЕНИТЕ

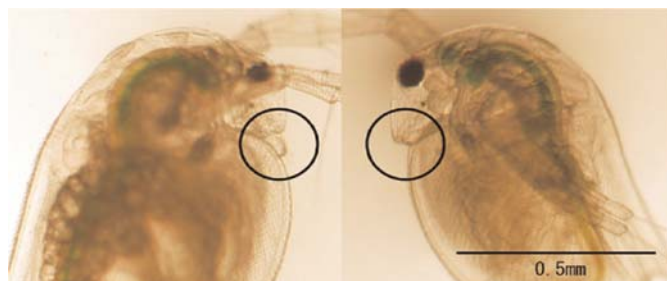
Мъжки новородени могат да се получат при променящи се условия на околната среда, като например скъсяване на периода на излагане на светлина, температура, намаляване на концентрацията на храните и увеличаване на гъстотата на популацията (Hobaek and Larson, 1990; Kleiven *et al.*, 1992). Получаването на мъжко потомство е също така известен отговор на някои регулатори на растежа на насекомите (Oda *et al.*, 2005). При условия, при които химически стресови фактори предизвикват намаляване на годното за възпроизвеждане потомство от партеногенетичните женски животни, може да се очаква увеличение на броя на мъжките животни (ОИСР, 2008 г.). Въз основа на наличната информация не е възможно да се предвиди коя крайна точка ще бъде по-чувствителна — съотношението между половете или репродуктивността; независимо от това, налице са показания (позоваване „доклад за валидиране“, част 1), съгласно които това увеличение в броя на мъжките животни може да е по-малко чувствително от намалението на поколението. Тъй като основното предназначение на метода за изпитване е да се оцени броят на произлязлото поколение, появата на мъжки животни е незадължително наблюдение. Ако тази незадължителна крайна точка е оценена в дадено проучване, тогава следва да се ползва допълнителен критерий за валидност на изпитването — не повече от 5 % мъжки в контролите.

Най-практичният и лесен начин за разграничаване на пола на *Daphnia* е да използват техните фенотипни характеристики, тъй като мъжките и женските животни са генетично идентични и полът им се определя от околната среда. Мъжките и женските животни се различават по дължината и морфологията на първата двойка антени, които са по-дълги при мъжките, отколкото при женските (фиг. 1). Тази разлика се разпознава веднага след раждането, въпреки че по време на растежа се развиват и други вторични полови белези (напр. вж. фиг. 2 в Olmstead and LeBlanc, 2000).

За наблюдаване на морфологичния пол новородените, произлезли от всяко изпитвано животно, трябва да бъдат прехвърлени чрез пипета и поставени в блюдо на Петри със среда за изпитване. Средата се свежда до минимум, за да се ограничи движението на животните. Наблюдението на първата двойка антени може да се проведе под стереомикроскоп ($\times 10-60$).

Фигура 1

Мъжки (вляво) и женски (вдясно) от *D. magna* на възраст 24 часа. Мъжките животни могат да бъдат отличени от женските по дължината и морфологията на първата двойка антени, както е показано в кръговете (Tatarazako *et al.*, 2004).

**ПОЗОВАВАНИЯ**

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

▼M7

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439-449.



V.21. ПОЧВЕНИ МИКРООРГАНИЗМИ: ИЗПИТВАНЕ НА АЗОТНАТА ТРАНСФОРМАЦИЯ

1. МЕТОД

Този метод е идентичен с OECD TG 216 (2000).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Методът за изпитване представлява предназначен за лабораторни анализи метод за обследване на дългосрочните ефекти върху азотната трансформация на почвените микроорганизми при еднократна експозиция с химикали. Изпитването принципно се основава на Препоръките на Европейската и Средиземноморската организация за защита на растенията (1). Други насоки обаче, включително тези на Немския биологичен институт (2), Американската агенция за защита на околната среда (3), SETAC (4) и Международната организация за стандартизация (5), също може да бъдат взети предвид. Семинарът на ОИСП за избор на почви/седименти, проведен в Belgirate, Италия, през 1995 г. (6), приема броя и вида на почвите, използвани при това изпитване. Препоръките за събиране, обработване и съхранение на почвената проба се основават на Ръководството на ISO (7) и препоръките от семинара в Belgirate. За междинните и окончателната оценка на токсичните характеристики на изпитваните вещества може да бъде изискано определянето на ефектите върху микробната активност на почвата, напр. когато се изискват данни за потенциалната големина на ефектите върху почвената микрофлора от продуктите за защита на зърнените култури или когато се очаква експозиция на почвените микроорганизми от химикали, които не са продукти за защита на зърнени култури. Изпитването за азотна трансформация се провежда, за да се определят ефектите от такива химикали върху почвената микрофлора. Ако се изпитват агрохимикали (напр. продуктите за защита на зърнените култури, торове, химикали за защита на горите), се провеждат едновременно азотна и въглеродна трансформация. Ако не се изпитват агрохимикали, достатъчно е изпитването за азотна трансформация. Ако обаче стойностите на EC₅₀ на такива химикали при изпитването на азотната трансформация са в обхвата на наличните в естествено състояние (натурални) нитрификационни инхибитори (напр. нитрапирин), трябва да бъде проведено и изпитване на въглеродната трансформация, за да се събере повече информация.

Почвите се състоят от живи и неживи компоненти, които съществуват в комплексни хетерогенни смеси. Микроорганизмите играят важна роля в разграждането и трансформирането на органичната материя в наторените почви, като различните видове способстват по различен начин за почвеното плодородие. Всяко дългосрочно влияние при тези биохимични процеси по всяка вероятност може да окаже влияние на цикъла на хранене, а това би могло да измени плодородието на почвата. Във всички наторени почви се извършват трансформации на азота и въглерода. Въпреки че микробните общества в различните почви отговарят различно на тези процеси, начините на трансформация в основата си са едни и същи.

Описаният метод за изпитване е предназначен за откриване на дългосрочните вредни ефекти от вещество, в хода на азотната трансформация, при почви с аеробна повърхност. Методът за изпитване позволява също да се оценят ефектите от веществото при въглеродна трансформация, извършвана от почвената микрофлора. Образуването на нитрат се провежда последователно при разграждане на въглерод-азотните връзки. Следователно ако в третираните и контролните проби са установени равни стойности на образувания нитрат, много вероятно е постигането в най-висока степен на цялостното и пълно разграждане на въглерода. Избраният за изпитването субстрат (люцерна в прахообразна форма) е в предпочетено въглерод-азотно съотношение (обикновено между 12/1 и 16/1). Поради това по време на изпитването се ограничава въглеродното „гладуване“ и ако микробните общества се изменят вследствие на прилагането на химикал, те могат да се самовъзстановят в рамките на 100-дневен период от време.

▼B

Изпитванията, въз основа на които е разработен този метод, са предназначени предимно за вещества, за които може да се предположи количеството, до което почвата достига. Такъв е случаят например с продуктите за защита на зърнените култури, за които апликационното ниво е известно. За агрохимикали е достатъчно изпитване с две дози, съответстващо на очакваното или предпологаното апликационно ниво. Агрохимикалите могат да бъдат изпитвани като активни съставки (a.i.) или като получени продукти. Обаче изпитването не се ограничава до агрохимикали. Чрез промяна едновременно на количествата на изпитваното вещество, прилагано върху почвата, и на начина, по който се оценяват данните, изпитването може също да бъде приложено при химикали, за които е известно количеството, което се очаква почвата да достигне. По такъв начин се определят ефектите при азотна трансформация от сериите концентрации на химикали, които не са агрохимикали. Данните от тези изследвания се използват за изготвянето на кривата доза-отговор и за изчисляване на стойностите на EC_x , където x е определеният в проценти ефект.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Азотна трансформация: е пълното разграждане от микроорганизми на азот-съдържаща органична материя, през етапи на амонификация и нитрификация до образуване на съответния неорганичен краен продукт — нитрат.

EC_x (ефективна концентрация): е концентрацията на изпитваното вещество в почвата, която води до x % задържане на трансформацията на азота до нитрат.

EC_{50} (средна ефективна концентрация): е концентрацията на изпитваното вещество в почвата, която води до 50 процента (50 %) задържане на преобразуването на азота до нитрат.

1.3. РЕФЕРЕНТНИ ВЕЩЕСТВА

Няма.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Пресята почва се подправя с растителна храна в прахообразна форма и всяка проба се третира с изпитваното вещество или остава необработена с него (контрола). Ако се изпитва агрохимикал, се препоръчват минимум две концентрации за изпитване и те трябва да бъдат избрани във връзка с най-високата очаквана концентрация в тази област. След 0, 7, 14 и 28 дни от инкубирането пробите с третираните и контролните почви се екстрахират с подходящ разтворител и се определят количествата нитрат в екстрактите. Нивото на образувания нитрат в третираните проби се сравнява с нивото в контролите и се изчислява процентното отклонение в стойностите на третираните проби и контролите. Всички изпитвания траят поне 28 дни. Ако на 28-ия ден разликите между третираните и нетретираните почви са по-големи или равни на 25 %, измерванията продължават, но не по-дълго от 100 дни. Ако се изпитват агрохимикали, в почвените проби се добавят серия от концентрации на изпитваното вещество и след 28 инкубационни дни се измерват количествата на образувания нитрат в третираните и контролните проби. Резултатите от изпитванията с множество концентрации се анализират с използването на регресионен модел и се изчисляват стойностите на EC_x (т.е. EC_{50} , EC_{25} и/или EC_{10}). Вж. определенията.

1.5. ВАЛИДИРАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

Оценяването на резултатите от изпитването с агрохимикали се основава на относително малки разлики (т.е. средна стойност \pm 25 %) между нитратните концентрации в контролните и третираните почвени проби, така че големи отклонения в контролите могат да доведат до погрешни резултати. Следователно отклонението между еднаквите контролни образци трябва да бъде по-малко от \pm 15 %.

▼B

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

1.6.1. Апаратура

Използват се контейнери за изпитване, направени от химически инертен материал. Те трябва да бъдат с подходящ капацитет, в съответствие с използваната процедура за инкубиране на почви, т.е. инкубиране в насипно състояние или в серии от индивидуални почвени проби (вж. точка 1.7.1.2). Трябва да бъде обърнато внимание едновременно на минимизирането на водните загуби и на невъзпрепятстването на обмена на газове по време на изпитването (напр. изпитваните контейнери могат да бъдат покрити с перфорирано полиетиленово фолио). Когато се изпитват летливи вещества, трябва да бъдат използвани запечатващи се и газонепропускливи контейнери. Те трябва да бъдат с такъв размер, че приблизително една четвърт от техния обем да е пълна с почвената проба.

Използва се стандартно лабораторно оборудване, както следва:

- разбърквачо/клатачно устройство: механична клатачка или еквивалентно оборудване;
- центрифуга (3 000 g) или филтриращо устройство (използва се несъдържаща нитрати филтърна хартия);
- инструмент с подходяща чувствителност и способност за възпроизводимост на нитратния анализ.

1.6.2. Избор и брой на почвените проби

Използва се една-единствена почвена проба. Препоръчва се почвата да има характеристики, както следва:

- съдържание на пясък: не по-малко от 50 % и не повече от 75 %;
- рН: 5,5—7,5;
- съдържание на органичен въглерод: 0,5—1,5 %;
- микробната биомаса трябва да бъде измерена (8)(9) и нейното въглеродно съдържание трябва да бъде най-малко 1 % от общия органичен въглерод в почвата.

В повечето случаи почва с такива характеристики представлява случай на по-лоша ситуация и адсорбцията на изпитвания химикал е минимална, а наличността му в микрофлората е максимална. Следователно като цяло не е необходимо провеждането на изпитвания с други почви. Въпреки това при определени обстоятелства, напр. когато се очаква основно употребата на изпитваното вещество да е в определени почви, такива като кисели горски почви, или при електростатично заредени химикали, може да бъде необходимо да се използва допълнителна почвена проба.

▼B**1.6.3. Събиране и съхранение на почвени проби****1.6.3.1. Събиране**

Трябва да има налична подробна историческа информация за мястото в полето, откъдето е взета почва за изпитване. Подробностите включват: точно местоположение, растителна покривка, дати на третиране с продукти за защита на зърнени култури, обработване с органични и неорганични торове, прибавяне на биологични материали или аварийни замърсявания. Избраното място за вземане на почва трябва да позволява дългосрочна употреба. Постоянни пасища, поля с годишно зърнени култури (с изключение на царевицата) или гъсто засети зелени торища са подходящи за вземане на проби. Избраните места за вземане на проби не трябва да са били третирани с продукти за защита на зърнените култури поне една година преди вземането на пробите. Също никакви органични торове не трябва да бъдат прилагани поне шест месеца преди това. Употребата на минерални торове е приемлива само когато, в съответствие с изискванията за зърнени култури, почвени проби не трябва да бъдат вземани поне три месеца след използването на такива торове. Използването на почва, третирана с торове с известна биологична ефективност (напр. калциев цианамид), трябва да бъде избягвано.

Вземането на проби се избягва през или веднага след дълги (по-дълги от 30 дни) периоди на засушаване или валежи. Проби от разорани почви трябва да бъдат вземани на дълбочина от 0 до 20 cm. При зелени площи (пасища) или други почви, които не са били разоравани дълги периоди от време (поне един растежен сезон), максималната дълбочина за вземане на проби може да бъде малко повече от 20 cm (напр. до 25 cm).

Почвените проби трябва да се транспортират в контейнери при определена температура. Тези условия гарантират, че първоначалните свойства на почвата не са значително изменени.

1.6.3.2. Съхранение

Препоръчва се използването на прясно събрани почвени проби. Ако съхраняване в лабораторни условия не може да бъде избегнато, почвите могат да бъдат съхранявани на тъмно при 4 ± 2 °C в продължение максимум на три месеца. По време на съхраняването на почвите трябва да бъдат осигурени аеробни условия. Ако почвите са събрани от области, където са замръзнали през поне три месеца в годината, те могат да бъдат съхранени за шест месеца при температура от минус 18 °C до минус 22 °C. Микробната биомаса на съхраняваната почва се измерва преди всеки експеримент и съдържанието на въглерод в биомасата трябва да бъде поне 1 % от общото съдържание на органичен въглерод в почвата (вж. точка 1.6.2).

1.6.4. Обработване и подготовка на почвата преди изпитването**1.6.4.1. Предварителна инкубация**

Ако почвата ще бъде съхранявана (вж. точки 1.6.3.2), се препоръчва предварителна инкубация през периода от 2-рия до 28-ия ден. Температурата и съдържанието на влага в почвата при предварителната инкубация трябва да бъдат подобни на използваните при изпитването (вж. точки 1.6.4.2 и 1.7.1.3).

▼B**1.6.4.2. Физикохимични характеристики**

Почвата ръчно се почиства от големи предмети (напр. камъни, части от растения и др.) и тогава влагата се филтрира, без допълнително сушене, при размер на частиците, по-малък или равен на 2 mm. Съдържанието на влага в почвената проба трябва да бъде регулирано с дестилирана или дейонизирана вода до стойност между 40 % и 60 % от максималната способност за задържане на вода.

1.6.4.3. Изменение с органичен субстрат

Почвата трябва да бъде изменена (подобнена/захранена) с подходящ органичен субстрат, напр. люцерна-зелена трева (основен компонент: *Medicago sativa*) със съотношение C/N между 12/1 и 16/1. Препоръчаното съотношение люцерна: почва е 5 g люцерна за 1 kg почва (сухо тегло).

1.6.5. Подготовка на изпитваното вещество за прилагане в почвата

Изпитваното вещество обикновено се прилага чрез използване на носител. Носителят може да бъде вода (за водоразтворими вещества) или инертно твърдо вещество, като ситен кварцов пясък (размер на частиците: 0,1—0,5 mm). Употребата на течни носители, различни от вода (напр. органични разтворители, такива като ацетон, хлороформ), трябва да бъде избягвана, тъй като те могат да увредят микрофлората. Ако като носител се използва пясък, той може да бъде покрит с разтвореното или суспендирано в подходящ разтворител изпитвано вещество. В такива случаи разтворителят трябва чрез изпаряване да бъде отстранен преди смесването с почва. За оптимално разпространение на изпитваното вещество в почвата се препоръчва да се използва съотношение 10 g пясък на килограм почва (сухо тегло). Контролните проби се третира само с еквивалентни количества вода и/или кварцов пясък.

Когато се изпитват летливи химикали, трябва, доколкото е възможно, да бъдат избегнати загубите и експериментът трябва да бъде проведен при осигурено хомогенно разпределение в почвата (напр. изпитваното вещество трябва да бъде впръскано/вкарано в почвата на няколко места).

1.6.6. Изпитвани концентрации

Ако се изпитват агрохимикали, трябва да се използват поне две концентрации. По-ниската концентрация може да се отрази най-малко на максималното количество, което се очаква да достигне почвата при условията на експеримента, като се има предвид, че по-високата концентрация трябва да бъде кратна на по-ниската концентрация. Концентрациите на изпитваното вещество, добавяно към почвата, се изчисляват, като се приема, че има еднакво смесване в дълбочина от 5 cm и плътност на насипната почва 1,5. За агрохимикали, които се прилагат директно в почвата, или за химикали, за които може да бъде предвидено достигнатото количество в почвата, се препоръчва като изпитвани концентрации да се използват максимално предвидените концентрации в околната среда (РЕС) и пет времена за концентрация. Веществата, които се очаква да бъдат прилагани в почвата неколккратно за един сезон, трябва да бъдат изпитвани при концентрации, получени от умножението на РЕС и очаквания максимален брой приложения. По-високата концентрация обаче не трябва да превишава с повече от десет пъти стойността на максималното еднократно прилагано ниво. Ако не се изпитват агрохимикали, се прилага геометрична серия от поне пет концентрации. Изпитваните концентрации трябва да покриват обхвата, нужен за определяне стойностите на ЕС_x.

▼B

1.7. ПРЕДСТАВЯНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

1.7.1. **Условия на експозиция**1.7.1.1. *Третиране и контрол*

Ако се изпитват агрохимикали, почвата се разделя на три части с еднаква маса. Двете части се смесват с носителя, съдържащ продукта, а другата част се смесва с носителя, който не съдържа продукта (контрола). Препоръчва се използването на минимум три реплики на двете третирани и нетретираната почвена проба. Ако не се изпитват агрохимикали, почвата се разделя на шест части с еднаква маса. Пет от пробите се смесват с носителя, съдържащ изпитваното вещество, а шестата проба се изпитва с носителя, несъдържащ химикала. Препоръчва се използването на минимум три реплики на двете третирани проби и контролата. Трябва да се обърне внимание на осигуряването на хомогенно разпределение на изпитваното вещество в третирани почвени проби. По време на смесването трябва да бъде избягвано сбиването или кълбообразното натрупване на почвата.

1.7.1.2. *Инкубация на почвени проби*

Инкубация на почвените проби може да бъде извършена по два начина: като насипни проби от всяка третирана и нетретирана почва или като серия от индивидуални и с еднаква маса подпроби от всяка третирана и нетретирана почва. Когато обаче се изпитват летливи вещества, се извършва изпитване само със серия от индивидуални подпроби. Когато се инкубират почви в насипно количество, се приготвят големи количества от всички третирани и нетретиранни почви и за подпробите, които ще се анализират, се взема такова количество, каквото е необходимо за провеждане на изпитването. Първоначално приготвеното количество за всяко третиране и контрола зависи от големината на подпробите, броя на използваните при анализа реплики и максималния очакван брой на времената за изпитване. Почвите, които се инкубират в насипно количество, трябва да бъдат напълно смесени (хомогенизирани) преди отделянето на подпробите. Когато почвите се инкубират като серия от индивидуални почвени проби, всяка третирана или нетретирана почвена проба в насипно количество се разделя на необходимия брой подпроби и те се използват, както е необходимо. При експериментите, при които се очакват повече от две времена на изпитване, трябва да бъдат приготвени достатъчно подпроби, за да бъдат отчетени всички реплики и всички времена на изпитване. Поне три повтарящи се проби (реплики) трябва да бъдат инкубирани при аеробни условия (вж. точка 1.7.1.1). По време на всички изпитвания трябва да бъдат използвани подходящи контейнери с достатъчно пространство в горния си край, за да се избегне възникването на анаеробни условия. Когато се изпитват летливи вещества, изпитването трябва да бъде проведено само при серия индивидуални подпроби.

1.7.1.3. *Условия и продължителност на изпитването*

Изпитването се провежда на тъмно при стайна температура 20 ± 2 °C. Съдържанието на влага в почвените образци трябва да бъде поддържано по време на изпитването между 40 % и 60 % от максималната способност на почвата да задържа вода (вж. точка 1.6.4.2) в обхвата ± 5 %. Добавя се дестилирана, дейонизирана вода, ако е необходимо.

Минималната продължителност на изпитванията е 28 дни. Ако се изпитват агрохимикали, стойностите на образувания нитрат в третирани и контролните проби се сравняват. Ако те се различават с повече от 25 % на 28-ия ден, изпитването продължава, докато се получи разлика, равна или по-малка от 25 %, или за максимум 100 дни, която е по-малка. Ако не се изпитват агрохимикали, изпитването завършва след 28 дни. На 28-ия ден се определят количествата на нитрата в третирани и контролните почвени проби и се изчисляват стойностите на ЕС_x.

▼B**1.7.2. Вземане на проби и анализ на почви****1.7.2.1. Схема за вземане на почвени проби**

Ако се изпитват агрохимикали, почвените проби се анализират за нитрат в ден 0 и през 7-ия, 14-ия и 28-ия ден. Ако е необходимо удължаване на изпитването, трябва да бъдат направени допълнителни измервания през 14-дневни интервали след 28-ия ден.

Ако не се изпитват агрохимикали, се използват поне пет изпитвани концентрации и почвените проби се анализират за нитрати в началото (ден 0) и в края на периода на експозиция (28 дни). Може да бъде направено внезапно измерване, напр. през 7-ия ден, ако изглежда необходимо. Данните, получени на 28-ия ден, се използват за определяне стойността на EC_x за химикала. При желание данните от ден 0 на контролните проби също могат да бъдат използвани за оценяване на първоначалното количество на нитрата в почвата.

1.7.2.2. Анализ на почвените проби

Количеството на образувания нитрат се определя за всяка третирана и контролна реплика за времето на всяка проба. Нитратът се екстрахира от почвата чрез разклащане на пробите и подходящия екстрахиращ разтворител, напр. 0,1 M разтвор на калиев хлорид. Препоръчва се количество от 5 ml разтвор на KCl на грам сухо тегло почвен еквивалент. За оптимално екстрахиране контейнерите, в които се намират почвата и екстрахиращият разтвор, трябва да не бъдат по-пълни от половината им обем. Смесите се разклащат при 150 rpm в продължение на 60 минути. После смесите се центрофугират или филтрират и течните фази се анализират за нитрат. Течните екстракти, освободени от твърди частици, могат да бъдат съхранявани преди анализ при минус 20 ± 5 °C за период до шест месеца.

2. ДАННИ**2.1. ОБРАБОТВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Ако се изпитват агрохимикали, образуваният нитрат трябва да бъде записан за всяка повтаряща се почвена проба (реплика), а средните стойности от всички реплики трябва да бъдат представени в таблична форма. Стойностите на азотната трансформация трябва да бъдат оценявани чрез подходящи и общоприети статистически методи (напр. F-метод, 5 % ниво на значимост). Количествата на образувания нитрат се изразяват в mg нитрат/kg сухо тегло почва/ден. Стойността на получения нитрат при всяко третиране се сравнява с това на контролата и се изчислява процентното отклонение от контролата.

Ако изпитванията не са проведени с агрохимикали, количеството на образувания нитрат се определя за всяка реплика и се изготвя крива доза-отговор за оценка на стойностите на EC_x . Количествата на нитрата (т.е. mg нитрат/kg сухо тегло почва), открити в третираните проби след 28 дни, се сравняват с тези в контролите. От тези данни се изчисляват процентните стойности на задържане за всяка изпитана концентрация. Тези проценти се разпределят спрямо концентрацията и се използват статистически процедури за изчисляване на стойностите на EC_x . Доверителните интервали ($p = 0,95$) за изчислените EC_x също се определят чрез използване на стандартни процедури (10) (11) (12).

Изпитвани вещества, които съдържат големи количества азот, могат да подпомогнат получаването на количествата нитрат по време на изпитването. Ако тези вещества се изпитват при висока концентрация (напр. химикали, които се очаква да бъдат използвани при повтарящи се приложения), в изпитването трябва да бъдат включени и подходящи контроли (т.е. почва плюс изпитвано вещество, но без растителна храна). Данните от тези контроли трябва да бъдат използвани при изчисленията на EC_x .

▼B**2.2. ИНТЕРПРЕТИРАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

При оценяване на резултатите от изпитванията с агрохимикали, когато разликата в стойностите на образувания нитрат при по-слабото третиране (т.е. максималната предвиждана концентрация) и контрола е по-малка или равна на 25 % по всяко време на проби след 28-ия ден, продуктът може да бъде оценен като такъв, който няма дълготрайно влияние върху азотната трансформация в почвите. Когато се оценяват резултати от изпитвания с химикали, различни от агрохимикалите, се използват стойностите на EC₅₀, EC₂₅ и/или EC₁₀.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Протоколът от изпитването трябва да съдържа следната информация:

Пълно идентифициране на използваната почва, което включва:

- географско положение на мястото (географска ширина, географска дължина);
- историческа информация за мястото (т.е. покриваща растителност, третиране с продукти за защита на зърнените култури, третиране с торове, аварийно замърсяване и др.);
- използвани образци (напр. земеделска почва, гора и др.);
- дълбочина на вземане на пробата (cm);
- съдържание на пясък/тиня/глина (% сухо тегло);
- рН (във вода);
- съдържание на органичен въглерод (% сухо тегло);
- съдържание на азот (% сухо тегло);
- начална нитратна концентрация (mg нитрат/kg сухо тегло);
- способност за катионен обмен (mmol/kg);
- —микробилна биомаса в процентно съотношение с общия органичен въглерод;
- референции на използваните методи за определянето на всеки параметър;
- цялата информация, свързана със събирането и съхранението на почвени проби;
- подробности за предварителната инкубация на почвата, ако има.

Изпитвано вещество:

- физична природа и, където е подходящо, физикохимични свойства;
- данни за идентичността на химикала, където е подходящо, включително структурна формула, чистота (т.е. за продукти за защита на зърнени култури – процентът на активната съставка), съдържание на азот.

Субстрат:

източник на субстрата;

- състав (т.е. люцерна, люцерна-зелена трева);
- съдържание на азот и въглерод (% сухо тегло);
- размер на ситото (mm).

▼ B

Условия на изпитването:

- подробности за изменението на почвата с органичен субстрат;
- брой на използваните концентрации на изпитваното вещество и, където е подходящо, обосноваване на избраните концентрации;
- подробности около апликирането на изпитваното вещество в почвата;
- инкубационна температура;
- съдържание на влага в почвата при започване и по време на изпитването;
- метод на инкубация на използваната почва (т.е. в насипно количество или като серия от индивидуални почвени подпроби);
- брой на репликите (повтарящи се почвени проби);
- времена при вземане на пробите;
- използван метод за екстрахиране на нитрата от почвата.

Резултати:

аналитична процедура и оборудване, използвани при анализа на нитрата;

- таблични данни, включващи индивидуални и средни стойности от измерванията на нитрата;
- отклонения между репликите в третираните и контролните проби;
- обяснения на направените корекции в изчисленията, ако е подходящо;
- процентни отклонения в стойностите на образувания нитрат за времето на всяка проби или, ако е подходящо, EC_{50} с 95 % потвърдено ограничение, други EC_x (т.е. EC_{25} или EC_{10}) с доверителни интервали, и графика на кривата доза-отговор;
- статистическо обработване на резултатите;
- цялата информация и наблюдения, подпомагащи интерпретирането на резултатите.

4. ПРЕПРАТКИ

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1—16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1—1 (2nd eds., 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.
- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M. R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.
- (5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality — Biological Methods*.

▼B

- (6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italie, 18-20 janvier 1995.
- (7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrateinduced respiration method.
- (9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigationextraction method.
- (10) Litchfield, J. T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.*, 96, 99-113.
- (11) Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (12) Finney, D. J. (1978). *Statistical Methods in biological Assay*. Griffin, Weycombe, UK.

▼B**В.22. ПОЧВЕНИ МИКРООРГАНИЗМИ: ИЗПИТВАНЕ НА ВЪГЛЕРОДНАТА ТРАНСФОРМАЦИЯ****1. МЕТОД**

Този метод е идентичен с OECD TG 217 (2000).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Методът за изпитване представлява предназначен за лабораторни анализи метод за обследване на дългосрочните потенциални ефекти от еднократна експозиция на продуктите за защита на зърнените култури и други възможни химикали при преобразуването на въглерода от почвените микроорганизми. Изпитването принципно се основава на Препоръките на Европейската и Средиземноморската организация за защита на растенията (1). Други насоки обаче, включително тези на Немският национален биологичен институт (2), Американската агенция за защита на околната среда (3) и SETAC (4), също може да бъдат взети предвид. Семинарът на ОИСР за избор на почви/седименти, проведен в Belgiate, Италия, през 1995 г. (5), приема броя и вида на почвите, използвани при това изпитване. Препоръките за събиране, обработване и съхранение на почвената проба се основават на Ръководството на ISO (6) и препоръките от семинара в Belgiate.

За междинните и окончателната оценка на токсичните характеристики на изпитваните вещества може да бъде изискано определянето на ефектите върху микробната активност на почвата, напр. когато се изискват данни за потенциалната големина на ефектите върху почвената микрофлора от продуктите за защита на зърнените култури или когато се очаква експозиция на почвените микроорганизми от химикали, които не са продукти за защита на зърнени култури. Изпитването за въглеродна трансформация се провежда, за да се определят ефектите от такива химикали върху почвената микрофлора. Ако се изпитват агрохимикали (напр. продукти за защита на зърнените култури, торове, химикали за защита на горите), се провеждат едновременно азотна и въглеродна трансформация. Ако не се изпитват агрохимикали, достатъчно е изпитването за азотна трансформация. Ако обаче стойностите на EC_{50} на такива химикали при изпитването на азотната трансформация са в обхвата на наличните в естествено състояние (натуралните) нитрификационни инхибитори (напр. нитрапирин), трябва да бъде проведено и изпитване на въглеродната трансформация, за да се събере повече информация.

Почвите се състоят от живи и неживи компоненти, които съществуват в комплексни хетерогенни смеси. Микроорганизмите играят важна роля в разграждането и трансформирането на органичната материя в наторените почви, като различните видове способстват по различен начин за почвеното плодородие. Всяко дългосрочно влияние при тези биохимични процеси по всяка вероятност може да окаже влияние на цикъла на хранене, а това би могло да измени плодородието на почвата. Във всички плодородни почви се извършват трансформации на азота и въглерода. Въпреки че микробните съобщества в различните почви отговарят различно на тези процеси, начините на трансформация в основата си са едни и същи.

▼B

Този метод за изпитване е предназначен за откриване на дългосрочните вредни ефекти от вещество в хода на въглеродна трансформация при почви с аеробна повърхност. Методът е чувствителен към промени в размера и активността на микробните съобщества, отговорни за въглеродната трансформация, тъй като тези съобщества са зависими едновременно от въздействието на химикала и от въглеродно „гладуване“. Използва се пясъчна почва с ниско съдържание на органична материя. Тази почва се третира с изпитваното вещество и се инкубира при условия, позволяващи бърз микробен метаболизъм. При тези условия източниците на леснодостъпен въглерод в почвата бързо се изчерпват. Това причинява въглеродното „гладуване“, което едновременно убива микробните клетки и предизвиква латентност (летаргия) и/или спорообразуване. Ако изпитването продължи повече от 28 дни, сумата от тези реакции може да бъде измерена в (нетретирана почва) контроли като прогресивна загуба на метаболитно активната микробна биомаса (7). Ако биомасата във въглеродно трансформирани почви, при условията на провеждане на експеримента, се влияе от присъствието на химикал, тя не може да бъде върната за използване на същото ниво като контрола. Следователно смущенията, причинени от изпитваното вещество във всеки един момент от време през периода на провеждане на експеримента, често продължават до края на изпитването.

Изпитванията, въз основа на които е разработен този метод, са били предназначени предимно за вещества, за които може да се предположи количеството, до което почвата достига. Такъв е случаят, например, с продуктите за защита на зърнените култури, за които е известно апликационното ниво. За агрохимикали е достатъчно изпитване с две дози, съответстващо на очакваното или предполагащото апликационно ниво. Агрохимикалите могат да бъдат изпитвани като активни съставки (a.i.) или като получени (крайни) продукти. Обаче изпитването не се ограничава до химикали с предвидими концентрации в околната среда. Чрез промяна едновременно на количествата на изпитваното вещество, прилагано върху почвата, и на начина, по който се оценяват данните, изпитването може също да бъде приложено при химикали, за които не е известно количеството, което се очаква почвата да достигне. По такъв начин се определят ефектите от въглеродна трансформация при серия концентрации на химикали, които не са агрохимикали. Данните от тези изследвания се използват за изготвянето на кривата доза-отговор и за изчисляване на стойностите на EC_x , където x е определения в проценти ефект.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Въглеродна трансформация: е микроорганичното разграждане на органична материя до образуване на неорганичния краен продукт въглероден диоксид.

EC_x (ефективна концентрация): е концентрацията на изпитваното вещество в почвата, която води до x % задържане на преобразуването на въглерода във въглероден диоксид.

EC_{50} (средна ефективна концентрация): е концентрацията на изпитваното вещество в почвата, която води до 50 % задържане на преобразуването на въглерода във въглероден диоксид.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Няма.

▼B

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Пресятата почва или се третира с изпитваното вещество, или остава нетретирана (контрола). Ако се изпитват агрохимикали, се препоръчват минимум две концентрации за изпитване и те трябва да бъдат избрани във връзка с най-високата очаквана концентрация в тази област. След 0, 7, 14 и 28 дни от инкубирането пробите с третираните и контролните почви се смесват с глюкоза и се измерват нивата на глюкозно предизвиканата респирация за 12-часов непрекъснат интервал от време. Респираторните нива се изразяват като отделен въглероден диоксид (mg въглероден диоксид/kg суха почва/h) или погълнат кислород (mg кислород/kg почва/h). Средното респираторно ниво в третираните почвени проби се сравнява с това в контролите и се изчислява процентното отклонение в нивото на третираните проби и контролите. Всички изпитвания траят поне 28 дни. Ако на 28-ия ден разликите между третираните и нетретираните почви са по-големи или равни на 25 %, измерванията продължават на 14-дневни интервали в продължение на максимум 100 дни. Ако се изпитват химикали, които не са агрохимикали, в почвените проби се добавят серия от концентрации на изпитваното вещество и след 28 инкубационни дни се измерват нивата на глюкозно предизвиканата респирация (т.е. средно количествата на образувания въглероден диоксид или погълнатия кислород). Резултатите от изпитванията със сериите от концентрации се анализират чрез използване на регресионен модел и се изчисляват стойностите на EC_x (т.е. EC_{50} , EC_{25} и/или EC_{10}). Вж. определенията.

1.5. ВАЛИДИРАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

Оценяването на резултатите от изпитването с агрохимикали се основава на относително малки разлики (т.е. средна стойност ± 25 %) между отделяния въглероден диоксид или погълнатия кислород във (или чрез) контролните и третираните почвени проби, така че големи отклонения в контролите могат да доведат до погрешни резултати. Следователно отклонението между еднаквите контролни образци трябва да бъде по-малко от ± 15 %.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

1.6.1. Апаратура

Използват се контейнери за изпитване, направени от химически инертен материал. Те трябва да бъдат с подходящ капацитет, в съответствие с използваната процедура за инкубиране на почви, т.е. инкубиране в насипно състояние или в серии от индивидуални почвени проби (вж. точка 1.7.1.2). Трябва да бъде обърнато внимание едновременно на минимизирането на водните загуби и на невъзпрепятствания обмен на газове по време на изпитването (напр. изпитваните контейнери могат да бъдат покрити с перфорирано полиетиленово фолио). Когато се изпитват летливи вещества, трябва да бъдат използвани запечатващи се и газонепропускливи контейнери. Те трябва да бъдат с такъв размер, че приблизително една четвърт от техния обем да е пълна с почвената проба.

За определяне на глюкозно предизвиканата респирация са необходими инкубационна система и инструменти за измерване производството на въглероден диоксид или консумацията на кислород. Примери за такива системи и инструменти могат да бъдат намерени в препратки (8) (9) (10) (11).

1.6.2. Избор и брой на почвените проби

Използва се една-единствена почвена проба. Препоръчва се почвата да има характеристики, както следва:

— съдържание на пясък: не по-малко от 50 % и не повече от 75 %;

▼B

- рН: 5,5—7,5;
- съдържание на органичен въглерод: 0,5—1,5 %;
- микробната биомаса трябва да бъде измерена (12) (13) и нейното въглеродно съдържание трябва да бъде поне 1 % от общия органичен въглерод в почвата.

В повечето случаи почва с такива характеристики представлява по-лоша ситуация и адсорбцията на изпитвания химикал е минимална, а наличността му в микрофлората е максимално. Следователно като цяло не е необходимо провеждането на изпитвания с други почви. Въпреки това при определени обстоятелства, напр. когато се очаква основно употребата на изпитваното вещество да е в определени почви, такива като кисели горски почви или при електростатично заредени химикали, може да бъде необходимо да се замени с допълнителна почвена проба.

1.6.3. Събиране и съхранение на почвени проби

1.6.3.1. Събиране

Трябва да има налична подробна историческа информация за мястото в полето, откъдето е взета почва за изпитване. Подробностите включват: точно местоположение, растителна покривка, дати на третиране с продукти за защита на зърнени култури, обработване с органични и неорганични торове, прибавяне на биологични материали или аварийни замурсывания. Избраното място за вземане на почва трябва да позволява дългосрочна употреба. Постоянни пасища, поля с годишни зърнени култури (с изключение на царевицата) или гъсто засети зелени торища са подходящи за вземане на проби. Избраните места за вземане на проби не трябва да са били третирани с продукти за защита на зърнените култури поне една година преди вземането на пробите. Също така никакви органични торове не трябва да бъдат прилагани поне шест месеца преди това. Употребата на минерални торове е приемлива само когато, в съответствие с изискванията за зърнени култури, почвени проби не трябва да бъдат вземани поне три месеца след използването на такива торове. Използването на почва, третирана с торове с известна биологична ефективност (напр. калциев цианамид), трябва да бъде избягвано.

Вземането на проби се избягва през или веднага след дълги (по-дълги от 30 дни) периоди на засушаване или валежи. Проби от разорани почви трябва да бъдат вземани на дълбочина от 0 до 20 cm. При зелени площи (пасища) или други почви, които не са били разоравани дълги периоди от време (поне един растежен сезон), максималната дълбочина за вземане на проби може да бъде малко повече от 20 cm (напр. до 25 cm). Почвените проби трябва да се транспортират в контейнери при определена температура. Тези условия гарантират, че първоначалните свойства на почвата не са значително изменени.

1.6.3.2. Съхранение

Препоръчва се използването на пряко събрани почвени проби. Ако съхраняване в лабораторни условия не може да бъде избегнато, почвите могат да бъдат съхранявани на тъмно при 4 ± 2 °C в продължение максимум на три месеца. По време на съхраняването на почвите, трябва да бъдат осигурени аеробни условия. Ако почвите са събрани от области, където са замръзнали през поне три месеца в годината, те могат да бъдат съхранени за шест месеца при минус 18 °C. Микробната биомаса на съхраняваната почва се измерва, преди всеки експеримент и съдържанието на въглерод в биомасата трябва да бъде поне 1 % от общото съдържание на органичен въглерод в почвата (вж. точка 1.6.2).

▼B**1.6.4. Обработване и подготовка на почвата преди изпитването****1.6.4.1. Предварителна инкубация**

Ако почвата ще бъде съхранявана (вж. точки 1.6.4.2 и 1.7.1.3), се препоръчва предварителна инкубация през периода от 2-рия до 28-ия ден. Температурата и съдържанието на влага в почвата при предварителната инкубация трябва да бъдат подобни на използваните при изпитването (вж. точки 1.6.4.2 и 1.7.1.3).

1.6.4.2. Физикохимични характеристики

Почвата ръчно се почиства от големи предмети (напр. камъни, части от растения и др.) и тогава влагата се филтрира, без допълнително сушене, при размер на частиците, по-малък или равен на 2 mm. Съдържанието на влага в почвената проба трябва да бъде регулирано с дестилирана или дейонизирана вода до стойност между 40 % и 60 % от максималната способност за задържане на вода.

1.6.5. Подготовка на изпитваното вещество за прилагане в почвата

Изпитваното вещество обикновено се прилага чрез използване на носител. Носителят може да бъде вода (за водоразтворими вещества) или инертно твърдо вещество, като фин кварцов пясък (размер на частиците: 0,1—0,5 mm). Употребата на течни носители, различни от вода (напр. органични разтворители, такива като ацетон, хлороформ), трябва да бъде избягвана, тъй като те могат да увредят микрофлората. Ако като носител са използва пясък, той може да бъде покрит с разтвореното или суспендирано в подходящ разтворител изпитвано вещество. В такива случаи разтворителят трябва да бъде отстранен чрез изпаряване преди смесването с почва. За оптимално разпределение на изпитваното вещество в почвата се препоръчва да се използва съотношение 10 g пясък на килограм почва (сухо тегло). Контролните проби се третира само с еквивалентни количества вода и/или кварцов пясък.

Когато се изпитват летливи химикали, при провеждането на експеримента трябва да бъдат избегнати загубите и експериментът трябва да бъде проведен при осигурено хомогенно разпределение в почвата (напр. изпитваното вещество трябва да бъде впръскано/вкарано в почвата на няколко места).

1.6.6. Изпитвани концентрации

Ако се изпитват агрохимикали или други химикали с предвидими концентрации в околната среда, трябва да се използват поне две концентрации. Трябва да се въздейства с по-ниската концентрация. По-ниската концентрация рефлектира най-малко на максималното количество, което се очаква да достигне почвата при условията на експеримента, като се има предвид, че по-високата концентрация трябва да бъде кратна на по-ниската концентрация. Концентрациите на изпитваното вещество, добавяно към почвата, се изчисляват, като се приема, че има еднакво смесване в дълбочина от 5 cm и плътност на насипната почва 1,5. За агрохимикали, които се прилагат директно в почвата, или за химикали, за които може да бъде предвидено достигнатото количество в почвата, се препоръчва като изпитвани концентрации да се използват максимално предвидените концентрации в околната среда (РЕС) и пет времена за концентрация. Веществата, които се очаква да бъдат прилагани в почвата неколккратно за един сезон, трябва да бъдат изпитвани при концентрации, получени от умножението на РЕС и очаквания максимален брой приложения. По-високата концентрация обаче не трябва да превишава с повече от десет пъти стойността на максималното еднократно прилагано ниво.

Ако не се изпитват агрохимикали, се използват геометрични серии от поне пет концентрации. Изпитваните концентрации трябва да покриват обхвата, необходим за определянето на стойностите на ЕС_x.

▼B

1.7. ПРОВЕЖДАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

1.7.1. Условия на експозиция

1.7.1.1. Третиране и контрол

Ако се изпитват агрохимикали, почвата се разделя на три части с еднаква маса. Двете части се смесват с носителя, съдържащ продукта, а другата част се смесва с носителя, който не съдържа продукта (контрола). Препоръчва се използването на минимум три реплики на двете третирани и нетретирания почвена проба. Ако не се изпитват агрохимикали, почвата се разделя на шест части с еднаква маса. Пет от пробите се смесват с носителя, съдържащ изпитваното вещество, а шестата проба се изпитва с носителя, не съдържащ химикала. Препоръчва се използването на минимум три реплики на двете третирани проби и контролата. Трябва да се обърне внимание на осигуряването на хомогенно разпределение на изпитваното вещество в третирания почвени проби. По време на смесването трябва да бъде избягвано сбиването или кълбообразното натрупване на почвата.

1.7.1.2. Инкубация на почвени проби

Инкубация на почвените проби може да бъде извършена по два начина: като насипни проби от всяка третирана и нетретирана почва или като серия от индивидуални и с еднаква маса подпроби от всяка третирана и нетретирана почва. Когато обаче се изпитват летливи вещества, се извършва изпитване само със серия от индивидуални подпроби. Когато се инкубират почви в насипно количество, се приготвят големи количества от всички третирани и нетретирани почви и за подпробите, които ще се анализират, се взема такова количество, каквото е необходимо за провеждане на изпитването. Първоначално приготвеното количество за всяко третиране и контрола зависи от големината на подпробите, броя на използваните при анализа реплики и максималния очакван брой на времената за изпитване. Почвите, които се инкубират в насипно количество, трябва да бъдат напълно смесени (хомогенизирани) преди отделянето на подпробите. Когато почвите се инкубират като серия от индивидуални почвени проби, всяка третирана или нетретирана почвена проба в насипно количество се разделя на необходимия брой подпроби и те се използват, както е необходимо. При експериментите, при които се очакват повече от две времена на изпитване, трябва да бъдат приготвени достатъчно подпроби, за да бъдат отчетени всички реплики и всички времена на изпитване. Поне три повтарящи се проби (реплики) трябва да бъдат инкубирани при аеробни условия (вж. точка 1.7.1.1). По време на всички изпитвания трябва да бъдат използвани подходящи контейнери с достатъчно пространство в горния си край, за да се избегне възникването на анаеробни условия. Когато се изпитват летливи вещества, изпитването трябва да бъде проведено само при серия индивидуални подпроби.

1.7.1.3. Условия и продължителност на изпитването

Изпитването се провежда на тъмно при стайна температура 20 ± 2 °C. Съдържанието на влага в почвените образци трябва да бъде поддържано по време на изпитването между 40 % и 60 % от максималната способност на почвата да задържа вода (вж. точка 1.6.4.2) в обхвата ± 5 %. Добавя се дестилирана дейонизирана вода, ако е необходимо. Минималната продължителност на изпитванията е 28 дни.

Ако се изпитват агрохимикали, количествата на отделения въглероден диоксид или на погълнатия кислород в третиранияте и контролните проби се сравняват. Ако те се различават с повече от 25 % на 28-ия ден, изпитването продължава, докато се получи разлика, равна или по-малка от 25 %, или за максимум 100 дни, която е по-малка. Ако не се изпитват агрохимикали, изпитването завършва след 28-ия ден. На 28-ия ден се определя количеството на отделения въглероден диоксид или на погълнатия кислород в третиранияте и контролните почвени проби и се изчисляват стойностите на ES_x .

▼B**1.7.2. Вземане на проби и анализ на почви****1.7.2.1. Схема за вземане на почвени проби**

Ако се изпитват агрохимикали, почвените проби се анализират за нива на глюкозно предизвиканата респирация през деня 0, 7-ия, 14-ия и 28-ия ден. Ако е необходимо удължаване на изпитването, трябва да бъдат направени допълнителни измервания през 14-дневни интервали след 28-ия ден.

Ако не се изпитват агрохимикали, се използват поне пет изпитвани концентрации и почвените проби се анализират за глюкозно предизвикана респирация в началото (ден 0) и в края на периода на експозиция (28 дни). Може да бъде направено внезапно измерване, напр. през 7-ия ден, ако изглежда необходимо. Данните, получени на 28-ия ден, се използват за определяне стойността на EC_x за химикала. Ако желаете, данните от ден 0 на контролните проби също могат да бъдат използвани за оценяване на първоначалното количество на метаболично-активната микробиална биомаса в почвата (12).

1.7.2.2. Измерване на нивата на глюкозно- предизвиканата респирация

Ниво на глюкозно предизвиканата респирация се определя за всяка третирана и контролна реплика за всяко време на всяка проба. Почвените проби се смесват с допълнително количество глюкоза, за да се предизвика незабавен максимален респираторен отговор. Количеството глюкоза, необходимо за предизвикването на максимален респираторен отговор от дадена почва, може да бъде определено при предварителни изпитвания чрез използването на серия глюкозни концентрации (14). Въпреки това при пясъчни почви с 0,5—1,5 % органичен въглерод, от 2 000 mg до 4 000 mg глюкоза за kg сухо тегло почва, определено са достатъчни. Глюкозата може да бъде стрита на пудра с чист кварцов пясък (10 g пясък/kg сухо тегло почва) и хомогенно смесена с почва.

Изменените с глюкозата почвени проби са инкубирани в подходяща апаратура за продължително измерване на респираторните нива на всеки час или на всеки два часа (вж. точка 1.6.1) при 20 ± 2 °C. Отделянето на въглероден диоксид или поглъщането на кислород се измерва в продължение на 12 поредни часа и измерванията трябва да започнат колкото е възможно по-рано, т.е. в рамките на 1 до 2 часа след прибавянето на глюкозата. Общото количество на отделения въглероден диоксид или погълнатият кислород през тези 12 часа се измерва и се определят средните респираторни нива.

2. ДАННИ**2.1. ОБРАБОТВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Ако се изпитват агрохимикали, отделяният въглероден диоксид или поглъщаният кислород се записват за всяка повтаряща се почвена проба (реплика), а средните стойности на всички реплики трябва да бъдат представени в таблична форма. Резултатите трябва да бъдат оценявани чрез подходящи и общоприемливи статистически методи (напр. F-тест, 5 % ниво на значимост). Нивата на глюкозно предизвиканата респирация се изразяват в mg въглероден диоксид/kg сухо тегло почва/h или mg кислород/сухо тегло почва/h. Средното ниво на образувания въглероден диоксид или средното ниво на погълнатия кислород при всяко третиране се сравнява с това на контролата и се изчислява процентното отклонение от контролата.

▼B

Ако изпитванията не са проведени с агрохимикали, количеството на отделения въглероден диоксид или на погълнатия кислород се определя за всяка реплика и се изготвя крива доза-отговор за оценка на стойностите на EC_x . Нивата на глюкозно предизвиканата респирация (т.е. mg въглероден диоксид/kg сухо тегло почва/h или mg кислород/сухо тегло почва/h), открити в третираните проби след 28 дни, се сравняват с тези, открити в контролите. От тези данни се изчисляват процентните стойности на задържане за всяка изпитана концентрация. Тези проценти се разпределят спрямо концентрацията и се използват статистически процедури за изчисляване на стойностите на EC_x . Доверителните интервали ($p = 0,95$) за изчислените EC_x също се определят чрез използване на стандартни процедури (15) (16) (17).

2.2. ИНТЕРПРЕТИРАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

При оценяване на резултатите от изпитванията с агрохимикали, когато разликата в респираторните нива между по-слабото третиране (т.е. максималната предвиждана концентрация) и контролата е по-малка или равна на 25 % по всяко време за вземане на проби след 28-ия ден, продуктът може да бъде оценен като такъв, който няма дълготрайно влияние върху преобразуването на въглерода в почвите. Когато се оценяват резултати от изпитвания с химикали, различни от агрохимикалите, се използват стойностите на EC_{50} , EC_{25} и/или EC_{10} .

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването трябва да съдържа следната информация:

Пълно идентифициране на използваната почва, което включва:

- географско положение на мястото (географска ширина, географска дължина);
- историческа информация за мястото (т.е. покриваща растителност, третиране с продукти за защита на зърнените култури, третиране с торове, аварийно замърсяване и др.);
- употреба на образци (напр. земеделска почва, гора и др.);
- дълбочина на вземане на пробата (cm);
- съдържание на пясък/тиня/глина (% сухо тегло);
- рН (във вода);
- съдържание на органичен въглерод (% сухо тегло);
- съдържание на азот (% сухо тегло);
- способност за катионен обмен (mmol/kg);
- начална микробна биомаса в процентно съотношение с общия органичен въглерод;
- референции на използваните методи за определянето на всеки параметър;
- цялата информация, свързана със събирането и съхранението на почвени проби;
- подробности за предварителната инкубация на почвата, ако има.

▼B

Изпитвано вещество:

- физична природа и, където е подходящо, физикохимични свойства;
- данни за идентичността на химикала, където е подходящо, включително структурна формула, чистота (т.е. за продукти за защита на зърнени култури – процент на активната съставка), съдържание на азот.

Условия на изпитването:

- подробности за замяната на почвата с органичен субстрат;
- брой на използваните концентрации на изпитваното вещество и, където е подходящо, обосноваване на избраните концентрации;
- подробности около апликирането на изпитваното вещество в почвата;
- инкубационна температура;
- съдържание на влага в почвата при започване и по време на изпитването;
- метод на инкубация на използваната почва (т.е. в насипно количество или като серия от индивидуални почвени проби);
- брой на репликите (повтарящи се почвени проби);
- времена при вземане на пробите.

Резултати:

- използвани метод и оборудване за измерване на респираторните нива;
- таблични данни, включващи индивидуални и средни стойности за количествата на въглеродния диоксид или кислорода;
- отклонения между репликите в третираните и контролните проби;
- обяснения на направените корекции в изчисленията, ако е подходящо;
- процентни отклонения в нивата на глюкозно предизвиканата респирация за всяко време на вземане на проби или, ако е подходящо, EC_{50} с 95 % потвърдено ограничение, други EC_x (т.е. EC_{25} или EC_{10}) с доверителни интервали, и графика на кривата доза-отговор;
- статистическо обработване на резултатите, където е подходящо;
- цялата информация и наблюдения, подпомагащи интерпретирането на резултатите.

4. ПРЕПРАТКИ

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1—16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1—1 (2nd eds., 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼ B

- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SET AC-Europe, Brussels.
- (5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18—20 January 1995.
- (6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in „Pesticide Effects on Soil Microflora“. Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45—60.
- (8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in „Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties“. Agronomy Monograph № 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R.Keeney. 41: 831—871.
- (9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1.Aerobic Conditions.
- (10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- (11) Heinemeyer, r O., Insam, H., Kaiser, E. A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77—81.
- (12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrateinduced respiration method.
- (13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigationextraction method.
- (14) Malkomes, H.- P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenbber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113—120.
- (15) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99—113.
- (16) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (17) Finney D. J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

B.23. АЕРОБНА И АНАЕРОБНА ТРАНСФОРМАЦИЯ В ПОЧВИ

1. МЕТОД

Този метод е идентичен с OECD TG 307 (2002)

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Този метод за изпитване се основава на съществуващите ръководства (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Методът, описан в настоящия метод за изпитване, е предназначен за оценяване на аеробната и анаеробната трансформация на химикали в почви. Провеждането на експериментите има за цел да се определят: i) степента на трансформация на изпитваното вещество, и ii) видът и нивата на образуване и намаляване на продуктите от трансформацията, на които растителните и почвените организми могат да бъдат изложени. Такива изпитвания се изискват за химикали, които директно се прилагат в почвата или които е вероятно да достигнат до почвата при условията на околната среда. При разработване на пробите могат също да бъдат използвани резултатите от тези лабораторни изпитвания и аналитичните протоколи от подобни изпитвания в тази област.

Аеробни и анаеробни изпитвания с един вид почва като цяло са достатъчни за оценяване на пътищата на трансформация (8) (10) (11). Нивата на трансформация трябва да бъдат определени при поне три допълнителни почви (8) (10).

Семинарът на ОИСР за избор на почви и седименти, проведен в Belgiate, Италия, през 1995 г. (10), приема по-специално броя и вида на почвите, използвани при настоящото изпитване. Видовете изпитвани почви трябва да бъдат представителни за условията на околната среда, при които ще се използват или ще бъдат изхвърлени. Например химикали, които могат да бъдат изпуснати (отделени) при условията на субтропичен до тропичен климат, трябва да бъдат изпитвани с Ferrasols или Nitosols (FAO система). На семинара също са представени препоръки, основани на Ръководството на ISO (15) за събиране, обработване и съхранение на почвените проби. В този метод се приема също използването на почви от оризища.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Изпитвано вещество: всяко вещество, независимо от това, дали е изходно съединение или съответен продукт от трансформацията.

Продукти от трансформацията: всички вещества, получени в резултат на реакциите при биотични и абиотични трансформации на изпитваното вещество, включително CO₂ и продуктите, които са в крайните остатъци.

Крайни остатъци: представляват съединения в почвата, растенията или животните, които остават в матрицата под формата на изходно вещество или негов(и) метаболит(и)/продукт, получен при трансформацията след екстрахиране. Методът за екстрахиране не трябва съществено да изменя самите съединения или структурата на матрицата. Би могло донякъде (частично) да се изясни природата на връзката чрез прилагане на екстракционни методи с промяна на матрицата и на сложни аналитични техники. Например по този начин се идентифицират ковалентни йонни и сорбционни връзки, а така също и включванията (при-меси). Най-общо, образуването на крайни остатъци намалява значително биологичния достъп и биологичната наличност (12) [изменено от IUPAC 1984 (13)].

Аеробна трансформация: реакциите протичат в присъствието на молекулен кислород (14).

▼B

Анаеробна трансформация: реакциите протичат в отсъствието на молекулен кислород (14).

Почва: е смес от минерални и органични химични съставки\компоненти, които съдържат съединения с високо съдържание на въглерод и азот в тях и с високи молекулни маси, състоящи се от живи малки (предимно микро-) организми. Почвата може да бъде третирана в две състояния:

- а) необработено, като тя се разработва с времето, в определени пластове на различните типове почви;
- б) обработено, като тя се намира обикновено в разораните площи или когато пробите са взети чрез разкопаване и се използват в този метод за изпитване (14).

Минерализация: е пълното разграждане на органично съединение до CO_2 и H_2O при аеробни условия и до CH_4 , CO_2 и H_2O при анаеробни условия. В контекста на този метод за изпитване, когато се използва съединение, което е маркирано с ^{14}C , минерализация означава пълното разграждане, по време на което маркиран въглероден атом се окислява, при което се отделя съответното количество $^{14}\text{CO}_2$ (14).

Време на полуразпад: $t_{0,5}$, е времето, при което е достигната 50 % трансформация на изпитвано вещество, когато трансформацията може да бъде описана чрез кинетика от първи ред; той не зависи от концентрацията.

DT_{50} (време на изчезване 50): е времето, за което концентрацията на изпитваното вещество намалява с 50 %; То е различно от времето на полуразпад $t_{0,5}$, тъй като трансформацията не следва кинетика от първи ред.

DT_{75} (време на изчезване 75): е времето, за което концентрацията на изпитваното вещество намалява със 75 %.

DT_{90} (време на изчезване 90): е времето, за което концентрацията на изпитваното вещество намалява с 90 %.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

За охарактеризиране и/или идентифициране на продуктите от трансформацията трябва да бъдат използвани вещества за сравнение в съответните спектроскопски и хроматографски методи.

1.4. ПРИЛОЖИМОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

Този метод е приложим за всички химични вещества (немаркирани или с маркиран радиоактивен изотоп), за които има аналитичен метод с достатъчна точност и чувствителност. Той е приложим за слабо летливи, нелетливи, водоразтворими или водонеразтворими съединения. Изпитването не трябва да бъде прилагано за химикали, които са силно летливи при прилагане върху почви (напр. дезинфекционни средства, органични разтворители), и поради това не биха могли да бъдат запазени в почвата при експерименталните условия на настоящото изпитване.

▼B**1.5. ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО**

За измерване на степента на трансформация могат да бъдат използвани немаркирани или маркирани изпитвани вещества. Необходимо е използването на маркиран материал за проследяване на пътя на трансформация и за установяване на масовия баланс. Препоръчва се маркиране ^{14}C , но употребата на други изотопи, такива като ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P , също може да бъде от полза. Доколкото е възможно, етикетът трябва да бъде поставен върху най-стабилната(ите) част(и) на молекулата⁽¹⁾. Изпитваното вещество трябва да бъде със степен на чистота минимум 95 %.

Преди извършване на изпитването за аеробна и анаеробна трансформация в почви трябва да бъде осигурена следната информация за изпитваното вещество:

- а) разтворимост във вода (метод А. 6);
- б) разтворимост в органични разтворители;
- в) парно налягане (метод А.4) и константата на Хенри;
- г) коефициент на съотношението п-октанол/вода (метод А.8);
- д) химична стабилност на тъмно (хидролиза) (метод В.7);
- е) рK_a, ако молекула е подложена на реакция, свързана с приемане или отнемане на протон [Ръководство на ОИСР 112] (16).

Друга полезна информация може да включва данни за токсичността на изпитваното вещество при почвените микроорганизми (Методи за изпитване В.21 и В.22) (16).

Трябва да има налични аналитични методи (включително методи за екстракция и почистване) за количествено определяне и идентифициране на изпитваното вещество и неговите продукти от трансформацията.

1.6. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Почвените проби се третират с изпитваното вещество и се инкубират на тъмно в колби биометричен вид или в проточни системи при контролирани лабораторни условия (като постоянна температура и влажност на почвата). След подходящи интервали от време почвените проби се екстрахират и анализират за изходното вещество и за продукти от трансформацията. Летливите продукти също се събират за анализ чрез използване на подходящи абсорбционни уреди. Когато се използва материал, маркиран с ^{14}C , могат да бъдат измерени различни степени на минерализация на изпитваното вещество чрез улавяне на отделяния $^{14}\text{CO}_2$ и чрез масовия баланс, включително може да бъде установено образуването на остатъчни количества в почвата.

1.7. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО**1.7.1. Възстановяване**

Екстрахиране и анализиране на най-малко две почвени проби веднага след добавяне на изпитваното вещество дава първоначална индикация за повторемостта на аналитичния метод и за еднаквото прилагане на апликационната процедура при изпитваното вещество. Възстановяванията на по-късните етапи на експеримента се представят чрез съответните масови баланси. Възстановяванията трябва да бъдат в обхвата от 90 % до 110 % за маркирани химикали (8) и от 70 % до 110 % за немаркирани химикали (3).

⁽¹⁾ Например, ако изпитваното вещество съдържа един пръстен, се изисква маркиране на този пръстен; ако изпитваното вещество съдържа два или повече пръстена, може да са необходими отделни изследвания за оценяване „жизнения цикъл“ на всеки маркиран пръстен, за да се придобие подходяща информация за образуването на продуктите от трансформацията.

▼B**1.7.2. Повторяемост и чувствителност на аналитичния метод**

Повторяемостта на аналитичния метод (с изключение на първоначалната екстракционна ефективност) за количествено определяне на изпитваното вещество и продуктите от трансформацията може да бъде проверена чрез дублиращи се анализи на един и същ почвен екстракт, инкубиран достатъчно дълъг период от време, за да се образуват продукти от трансформацията.

Границата на аналитичния метод за откриване (LOD) на изпитваното вещество и на продуктите от трансформацията трябва да бъде по-ниската стойност от поне $0,01 \text{ mg.kg}^{-1}$ почва (като изпитвано вещество) или от 1 % от приложената доза. Трябва да бъде определена също и границата за количествено определяне на метода (LOQ).

1.7.3. Прецизност на данните от трансформацията

Регресионният анализ на концентрациите на изпитваното вещество като функция от времето дава подходяща информация за надеждността на кривата на трансформация и позволява да се изчислят доверителните интервали на полуразпада (в случай на псевдокинетика от първи ред) или стойностите на DT_{50} и, ако е подходящо, стойностите на DT_{75} и DT_{90} .

1.8. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ**1.8.1. Оборудване и химични реагенти**

Инкубационните системи са статични затворени системи или подходящи проточни системи (7) (17). На фигури 1 и 2 са показани примери на проточна апаратура, подходяща за инкубиране на почви, и съответно биометричен тип колба. И двата вида инкубационни системи имат предимства и недостатъци (7) (17).

Изисква се стандартно лабораторно оборудване, и по-специално:

- аналитични инструменти, като GLC, HPLC, TLC оборудване, включително подходяща система за откриване на анализирани с маркиран радиоактивен изотоп или немаркирани вещества или противоположен метод с разреждане на изотопи;
- инструменти, използвани за целите на идентификацията (напр. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR и др.);
- течен сцинтилационен брояч (детектор);
- окислител за изгаряне на радиоактивни материали;
- центрифуга;
- екстракционна апаратура (например центрофужни епруветки за студена екстракция и Soxhlet апаратура за продължително екстрахиране при нагряване с обратен хладник);
- инструментариум за концентриране на разтвори и екстракти (напр. ротационен изпарител);
- водна баня;
- механично смесващо устройство (напр. месилна (разбъркваща) машина, ротационен миксер).

▼B

Като химични реагенти се използват например:

- NaOH, аналитически чиста за анализ, 2 mol.dm⁻³ или друга подходяща основа (напр. KOH, етаноламин);
- H₂SO₄, аналитически чиста за анализ, 0,05 mol.dm₃;
- етилен гликол, аналитически чист за анализ;
- твърди абсорбционни материали, такива като натронкалк (смес от натриев хидроксид и вар) и полиуретанови тапи;
- органични разтворители, аналитически чисти за анализ, такива като ацетон, метанол и др.;
- сцинтилационна течност.

1.8.2. Прилагане на веществото за изпитване

За прибавяне и разпространение в почвата изпитваното вещество може да бъде разтворено във вода (дейонизирана или дестилирана) или, когато е необходимо, в минимални количества ацетон или други органични разтворители (6), в които изпитваното вещество е достатъчно разтворимо и стабилно. Въпреки това количеството на избрания разтворител не трябва да оказва значително влияние върху микробната активност в почвата (вж. точки 1.5, 1.9.2 и 1.9.3). Трябва да се избягва употребата на такива разтворители, като хлороформ, дихлорметан и други халогенирани разтворители, които възпрепятстват (инхибират) микробната активност.

Изпитваното вещество може също да бъде добавено в твърд вид (агрегатно състояние), напр. смесено с кварцов пясък (6) или в малка подпроба от изпитваната почва, която се суши на въздух и се стерилизира. Ако изпитваното вещество се добавя, като се използва разтворител, разтворителят трябва да може да бъде изпарен, преди отделената подпроба да бъде добавена към първоначалната нестерилна почвена проба.

За обикновените химикали, чийто основен път на постъпване в почвата е чрез канализационните утайки/селскостопанска употреба, изпитваното вещество първо трябва да бъде добавено към утайката, която след това се въвежда в почвената проба (вж. точки 1.9.2 и 1.9.3).

Употребата на образуваните продукти обикновено не се препоръчва. Въпреки това обаче, напр. при слаборазтворими изпитвани вещества, използването на новообразуван материал може да бъде подходяща алтернатива.

1.8.3. Почви

1.8.3.1. Избор на почва

За определяне пътя (начина) на трансформацията може да бъде използвана „представителна“ почва; Препоръчва се да се използва пясъчна почва или наносна почва, или глина, или глинест пясък [съгласно класификацията на FAO и USD A (18)] с рН = 5,5—8,0, със съдържание на органичен въглерод 0,5—2,5 % и с микробна биомаса най-малко 1 % от общия органичен въглерод (10).

За установяване степента на трансформация трябва да бъдат използвани поне три допълнителни почви, представляващи обхват от съответните почви. Почвите трябва да са с различно (вариращо) съдържание на техния органичен въглерод, рН, съдържание на глина и микробна биомаса (10).

▼B

Всички почви трябва да бъдат охарактеризирани, поне по отношение на състава им (% пясък, % нанос, % глина) [съгласно класификацията на FAO и USD A (18)], pH, способност за катионен обмен, органичен въглерод, насипна плътност, способност за задържане на вода ⁽¹⁾ и микробна биомаса (само за аеробни изпитвания). Допълнителната информация за свойствата на почвата може да бъде от полза при интерпретирането на резултатите. За определянето на характеристиките на почвата, могат да бъдат използвани методите, препоръчани в препратки (19) (20) (21) (22) (23). Микробната биомаса трябва да бъде определена чрез прилагане на метода на субстратно индуцираната респирация (SIR) (25) (26) или алтернативни методи (20).

1.8.3.2. Събиране, обработване и съхранение на почви

Трябва да има подробна информация за историята (миналото) на мястото в полето, откъдето е била събрана почвата за изпитване. Подробностите включват точно местоположение, растителна покривка, обработване с химикали, третиране с органични и неорганични торове, добавки към биологични материали или друго замърсяване. Ако почвите са третирани с изпитваното вещество или с негов структурен аналог през предходните четири години, те не трябва да бъдат използвани за изследвания на трансформацията (10) (15).

Почвата трябва да бъде прясно събрана от полето (от хоризонт A или от горния 20 cm слой) с такова водно съдържание в нея, което да улеснява пресяването. За почви, различни от тези при наводнени повърхности, вземането на проби трябва да бъде избягвано през или веднага след дълги периоди (> 30 дни) на засушаване, замръзване или наводнение (14). Почвите трябва да бъдат транспортирани по начин, който свежда до минимум загубите на водно съдържание в почвата, и трябва да бъдат държани на тъмно, при свободен достъп до въздух, толкова дълго, колкото е възможно. Обикновено хлабаво завързан полиетиленов плик (чувал) е подходящ за тази цел.

Почвата трябва да бъде използвана възможно най-бързо след вземането ѝ за проби. Растителността, по-големите растителни части и камъни трябва да бъдат отстранени преди пресяването на почвата през 2 mm сито, чрез което се отстраняват малки камъни, растения и растителни части. Трябва да бъде избягвано продължителното сушене и стриване на почвата преди пресяването (15).

Когато вземането на почвени проби от повърхността е трудно през зимата (замръзнала почва или покрита от пластове сняг), проба може да бъде взета от почвена партида, съхранявана в оранжерия под растителна покривка (напр. трева или смесени туфи трева-детелина). Силно се препоръчва провеждането на изпитвания с прясно събрани от полето почви, но ако събраните и обработени почви трябва да бъдат съхранявани преди започване на изпитването, условията на съхранение трябва да бъдат адекватно подбрани и съхранението да продължи само определен период от време (4 ± 2 °C за максимум три месеца) за поддържане на микробната активност ⁽²⁾. Подробни инструкции за събирането, обработването и съхранението на почви, които ще бъдат използвани при биотрансформационни експерименти, могат да бъдат намерени в (8) (10) (15) (26) (27).

⁽¹⁾ Способността на почвата да задържа вода може да бъде измерена като повърхностен капацитет или като водно налягане на всмукване (pF). За обяснение вж. приложение 1. В протоколите от изпитването трябва да бъде отчетено дали характеристиките на почвата, свързани със способността ѝ да задържа вода, и насипната ѝ плътност са определени в необработвани повърхностни проби или в обработвани (преработени) проби.

⁽²⁾ Последните резултати от изследванията показват, че почвите от температурните зони могат също да бъдат съхранявани при - 20 °C за повече от три месеца (28)(29) без значителни загуби на микробната активност.

▼ **B**

Преди преработената почва да се използва в това изпитване, трябва да бъде извършена предварителна инкубация, която ще позволи поникване и отстраняване на семената, и възстановяване на равновесието в микробния метаболизъм, изменено от вземането на пробата или условията на съхранение или инкубация. Общоприето е прединкубационният период да трае между 2 и 28 дни при приблизително поддържане на условията — температура и влажност — като тези при реалното изпитване (15). Периодът на съхранение и прединкубационният период заедно не трябва да превишават три месеца.

1.9. ПРОВЕЖДАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

1.9.1. **Условия на изпитването**1.9.1.1. *Температура на изпитването*

През целия период от време за провеждане на изпитването почвите трябва да бъдат инкубирани на тъмно при постоянна температура, представителна за климатичните условия, при които ще се използва или освобождава веществото. Препоръчва се температурата да е 20 ± 2 °C за всички изпитвани вещества, които може да поеме почвата при климатичните температури. Температурата трябва да бъде наблюдавана.

За химикали, прилагани или освобождавани при по-студен климат (напр. в северните страни, през есенно-зимните периоди), трябва да бъдат инкубирани допълнителни почвени проби, но при по-ниска температура (напр. 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Съдържание на влага*

При изпитвания на трансформацията при аеробни условия трябва да бъде установено съдържанието на влага в почвата ⁽¹⁾ и влажността да бъде поддържана при rF между 2,0 и 2,5 (3). Съдържанието на влага в почвата се изразява като маса на водата към маса на сухата почва и трябва регулярно да бъде контролирано (напр. на двуседмични интервали от време) чрез претегляне на инкубационните колби и компенсиране на водните загуби чрез добавянето на вода (за предпочитане стерилно филтрирана чешмяна вода). Трябва да бъде отделено внимание на предотвратяването или минимизирането на загубите от изпитваното вещество и/или продуктите от трансформацията чрез изпаряване и/или фотолитиза (фоторазграждане) (ако има) по време на допълнителното овлажняване.

За изпитвания на трансформацията при анаеробни и наводнени условия почвата е напоена с вода чрез наводняване.

1.9.1.3. *Условия за аеробно инкубиране*

При проточни системи аеробни условия ще бъдат поддържани чрез прекъсвания за продухвания или чрез продължително (непрекъснато) проветряване с влажен въздух. В биометричните колби обменът на въздух се поддържа чрез дифузия.

1.9.1.4. *Стерилни аеробни условия*

За да се получи информация за съответствието на абиотичната трансформация на изпитвано вещество, почвените проби могат да бъдат стерилизирани (за методи за стерилизация вж. препратки 16 и 29), третирани със стерилизираното изпитвано вещество (напр. добавяне на разтвор през стерилен филтър) и аерирани с овлажен стерилен въздух, както е описано в точка 1.9.1.3. За наводнени почви почвата и водата трябва да бъдат стерилизирани и инкубацията трябва да бъде проведена, както е описано в точка 1.9.1.6.

⁽¹⁾ Почвата не трябва да бъде нито твърде влажна, нито прекалено суха, за да се поддържат подходящи аерация и хранене на почвената микрофлора. Препоръчва се съдържанието на влага в почвата за оптимален микробнален растеж да е в обхват 40 — 60 % за способността за задържане на вода (WHC) и от 0,1 до 0,33 bar (6). Последният (от двата) обхват е еквивалентен на rF обхвата от 2,0 до 2,5. Характерните стойности на влажността на различните видове почви са посочени в приложение 2.

▼ B1.9.1.5. *Условия за анаеробно инкубиране*

За създаване и поддържане на анаеробни условия почвата, третирана с изпитваното вещество и инкубирана при аеробни условия в продължение на 30 дни или едно време на полуразпад, или DT₅₀ (което е по-кратко), е в 1 — 3 cm воден слой и инкубационната система се продухва с инертен газ (напр. азот или аргон) ⁽¹⁾. Системата за изпитване трябва да позволява измервания на рН, концентрацията на кислород и редоксипотенциала, както и да включва улавящо устройство за летливите продукти. Биометричният вид система трябва да е затворена, за да се избегне проникването на въздух чрез дифузия.

1.9.1.6. *Условия за инкубиране при наводняване*

За проучване на трансформацията в наводнени оризови почви почвата се наводнява с воден слой, който е с дебелина около 1 — 5 cm, и изпитваното вещество се прилага във водната фаза (9). Препоръчва се почвата да е с дълбочина поне 5 cm. Системата се проветрява с въздух както при аеробните условия. рН, концентрацията на кислород и редоксипотенциалът на водния слой трябва да бъдат наблюдавани и отчитани. Необходимо е да има поне две седмици прединкубационен период преди започването на трансформационните изпитвания (вж. точка 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Продължителност на изпитването*

Продължителността (степената и пътят на протичане) на изпитването обикновено не трябва да превишава 120 дни ⁽²⁾ (3) (6) (8), тъй като след това трябва да се очаква понижаване във времето на почвената микробна активност в изкуствено създадената лабораторна система, която е изолирана от естествено допълване. Когато е необходимо за охарактеризиране намаляването на изпитваното вещество и образуването и намаляването на основните продукти от трансформацията, изпитванията могат да бъдат продължени за по-дълъг период от време (напр. 6 или 12 месеца) (8). По-дългите инкубационни периоди трябва да бъдат обосновани в протокола от изпитването и придружени от измервания на биомасата по време и в края на тези периоди.

1.9.2. **Провеждане на изпитването**

Около 50 до 200 g почва (на база сухо тегло) се поставят във всяка инкубационна колба (вж. фигури 1 и 2 от приложение 3) и почвата се третира с изпитваното вещество по един от методите, описани в точка 1.8.2. Когато за апликиране на изпитваното вещество се използват органични разтворители, те трябва да бъдат отстранени от почвата чрез изпаряване. Тогава почвата се смесва напълно, като за това се използва шпатула и/или се разклаща колбата. Ако изпитването се провежда при наводнени повърхностни условия, почвата и водата трябва да бъдат напълно смесени след прилагането на изпитваното вещество. За да се провери за хомогенното разпределение на изпитваното вещество, трябва да бъдат анализирани малки аликвоти (напр. 1 g) от третираните почви за изпитваното вещество. За алтернативен метод вижте по-долу.

⁽¹⁾ Аеробните условия са доминиращи при повърхностни почви и дори при почви под повърхността, както е показано в един изследователски проект, финансиран от EU [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17—21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. Анаеробни условия могат да възникнат само от време на време (случайно) при наводнение на почвите след тежки проливни валежи от дъжд или когато се създадат наводнени условия в оризовите полета.

⁽²⁾ Аеробните изпитвания могат да бъдат приключени в този момент (много преди осигурения 120-дневен период), при който ясно се констатира, че са достигнати крайният път на трансформиране и окончателната минерализация. Приключване на изпитването е възможно след 120 дни или при най-малко 90-процентна трансформация на изпитваното вещество, но само когато се е образувал най-малко 5 % CO₂.

▼B

Нивото на третиране трябва да съответства на най-високото апликационно ниво на продукт за защита на зърнените култури, препоръчвано в инструкциите за употреба, и по един и същ начин инкорпорирано на подходяща дълбочина в полето (напр. най-горния 10 cm почвен слой⁽¹⁾). Например за химикали, прилагани върху листата или в почвата без инкорпориране (смесване), подходящата дълбочина за изчисляване количеството химикал, което трябва да бъде добавено във всяка колба, е 2,5 cm. За инкорпорирани в почвата химикали подходящата дълбочина е определената в инструкциите за употреба дълбочина за инкорпориране. За обикновени химикали апликационното ниво трябва да бъде оценено въз основа на най-подходящия път за въвеждане; например когато основният път на постъпване в почвата е чрез канализационните утайки, химикалът трябва да бъде дозиран в утайката с такава концентрация, която да рефлектира върху очакваната концентрация на утайката, и количеството на утайката, добавено към почвата, трябва да се отрази (да повлияе) нормално на земеделските почви. Ако тази концентрация не е достатъчно висока за идентифицирането на основните продукти от трансформацията, може да бъде от полза инкубирането на отделни почвени проби, съдържащи по-високи нива, като крайните нива, влияещи на микробните функции на почвата, трябва да бъдат избягвани (вж. точки 1.5 и 1.8.2).

Алтернативно, по-големи партии почва (т.е. от 1 до 2 kg) могат да бъдат третирани с изпитваното вещество след внимателно смесване в подходящо смесително устройство и впоследствие прехвърляни на малки порции от 50 до 200 g в инкубационните колби (например с използването на разделител на пробите). Малки аликвотни части (напр. 1 g) от третиранията почвена партида трябва да се анализират за изпитваното вещество, за да се провери еднородното му разпределение. Предпочита се тази процедура, тъй като позволява по-равномерно разпределение на изпитваното вещество в почвата.

Така също нетретирани почвени проби се инкубират при същите условия (аеробни) както пробите, третирани с изпитваното вещество. Тези проби се използват за измерване на биомасата по време и в края на изпитванията.

Когато изпитваното вещество се прилага в почвата, разтворено в органичен(и) разтворител(и), почвените проби, третирани със същото количество разтворител(и), се инкубират при същите условия (аеробни) както пробите, третирани с изпитваното вещество. Тези проби се използват за измерване на биомасата в началото, по време и в края на изпитванията, за да се провери влиянието на разтворителя(ите) върху микробната биомаса.

Колбите, съдържащи третирани почви, се прикрепят към проточната система, описана във фигура 1, или се затварят в абсорбционната колона, показана на фигура 2 (вж. приложение 3).

⁽¹⁾ Началната концентрация се изчислява въз основа на следното уравнение:

$$C_{\text{soil}} [\text{mg}/\text{kg}_{\text{soil}}] = \frac{A [\text{kg}/\text{ha}] \cdot 10^6 [\text{mg}/\text{kg}]}{l [\text{m}] \cdot 10^4 [\text{m}^2/\text{ha}] \cdot d [\text{kg}_{\text{soil}}/\text{m}^3]}$$

C_{soil} = начална концентрация в почвата [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]

A = апликационно ниво [$\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$]; l = дебелина на почвения слой на полето [m]; d = насипна плътност на суха почва [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$].

Практическо правило за получаване на резултати е прилагане на апликационно ниво от $1 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ при концентрации в почвата приблизително $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ в 10 cm слой (приема се насипна плътност от $1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$).

▼B**1.9.3. Вземане на проби и измервания**

Колби с дублираща се инкубация се изваждат на подходящи интервали от време и почвените проби се екстрахират с подходящи разтворители с различен поляритет и се анализират за изпитваното вещество и/или продуктите от трансформацията. Добре подготвеното (проектираното) изпитване включва достатъчно колби, така че две колби да бъдат „пожертвани“ при експеримента с всяка проба. Така също абсорбционните разтвори или твърдите абсорбционни материали се отстраняват на различни интервали от време (7-дневни интервали през първия месец и след един месец на 17-дневни интервали) по времето и в края на инкубацията на всяка почвена проба и анализирани за летливи продукти. Освен почвена проба, взета директно (проба от ден 0), трябва да бъдат включени поне 5 допълнителни пробоотборни точки. Времевите интервали трябва да бъдат такива, че да могат да бъдат определени моделите на запазване на изпитваното вещество и моделите на образуване и запазване на продуктите от трансформацията (напр. 0, 1, 3, 7 дни; 2, 3 седмици; 1, 2, 3 месеца и т.н.).

Когато се използва изпитвано вещество, маркирано с ^{14}C , неекстрахируемата радиоактивност ще бъде количествено определена чрез изгаряне и за всеки интервал за проба ще бъде изчислен масов баланс.

В случай на анаеробна и инкубация при наводнение почвената и водната фаза се анализират заедно за изпитваното вещество и продукти от трансформацията или поотделно чрез филтриране или центрофугиране преди екстрахиране и анализирани.

1.9.4. Възможни (незадължителни) изпитвания

За оценка на влиянието на температурата и влагата на почвата върху степените на трансформация на изпитвано вещество и/или негови продукти от трансформация в почвата може да бъде от полза провеждането на аеробни нестерилни изпитвания при допълнителни температури и влажности на почвата.

За по-нататъшно охарактеризиране на неекстрахируемата радиоактивност например може да бъде използвана свръхкритична течна екстракция.

2. ДАННИ**2.1. ОБРАБОТВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Количествата на изпитваното вещество, продуктите от трансформацията, летливите вещества (само в проценти) и неекстрахируемите остатъци трябва да бъдат представени като процент от приложената начална концентрация и, където е подходящо, като mg.kg^{-1} почва (основана на сухо претеглена почва) за всеки интервал на проба. Трябва да бъде представен масов баланс като процент на приложената начална концентрация за всеки интервал на проба. Графичното представяне на концентрациите на изпитваното вещество спрямо времето ще позволи да се направи оценка на времето за достигане на неговия полуразпад при трансформацията или на DT_{50} . Основните продукти от трансформацията трябва да бъдат идентифицирани и техните концентрации също трябва да бъдат графично нанесени спрямо времето, за да се установят техните степени на образуване и задържане. Основен продукт от трансформацията е всеки продукт, представляващ $\geq 10\%$ от приложената доза във всеки момент по време на изпитването.

Уловените летливи продукти дават някои индикации за потенциалната летливост на изпитваното вещество и неговите продукти от трансформацията в почвата.

▼B

По-точно определяне на стойностите на времето за полуразпад или стойностите на DT_{50} и, ако е подходящо, DT_{75} и DT_{90} трябва да бъдат включени чрез прилагане на подходящ кинетичен модел при изчисленията. Стойностите на времето за полуразпад или DT_{50} трябва да бъдат отчетени при едновременно описание на използвания модел, кинетиката от първи ред и определящия коефициент (r^2). Предпочита се кинетиката от първи ред, освен ако $r^2 < 0,7$. Ако е подходящо, изчисления трябва да се направят и за основните продукти от трансформацията. Примери на подходящи модели са описани в препратки от 31 до 35.

В случай на изпитвания, проведени при различни температури, степените на трансформация трябва да бъдат описани като функция на температурата в експерименталния температурен обхват с използването на Арениусовата зависимост по формулата:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ или } \ln k = \ln A - \frac{B}{T}$$

където $\ln A$ и B са регресионни константи на пресичане и наклон, респективно, на най-добра свързваща линия, произхождаща от линейната регресия $\ln k$ спрямо $1/T$, k е скоростна константа при температура T и T е температура по Келвин. Трябва да бъде обърнато внимание на граничния температурен интервал, в който ще бъде валидна Арениусовата зависимост при случаите на трансформация, управлявана от микробната дейност.

2.2. ОЦЕНЯВАНЕ И ИНТЕРПРЕТИРАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Въпреки че изпитванията се провеждат в изкуствена лабораторна система, резултатите ще позволят да се оцени степента на трансформация на изпитваното вещество, а така също и степента на образуване и устойчивост на продуктите от трансформацията при условията на експеримента (36) (37).

Проучването на пътя на трансформацията осигурява информация за начина, по който чрез химични и микробни реакции приложеното вещество структурно се изменя в почвата

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването трябва да включва:

Изпитвано вещество:

- търговско наименование, химично наименование, CAS номер, структурна формула (показваща положението на етикета(ите)), когато се използва материал с маркиран радиоактивен изотоп) и съответните физикохимични свойства (вж. точка 1.5);
- степен на чистота (примеси) на изпитваното вещество;
- радиохимична степен на чистота на маркирания химикал и специфична активност (където е подходящо).

Вещества за сравнение:

- химично наименование и структура на веществата за сравнение, използвани за охарактеризиране и/или идентифициране на продукт от трансформацията.

Изпитвани почви:

- подробности за местата, от които са събирани;
- дата и процедура за вземане на почвени проби;

▼B

— свойства на почвите, такива като рН, съдържание на органичен въглерод, състав (% пясък, % наноси, % глина), способност за катионен обмен, насипна плътност, способност за задържане на вода и микробна биомаса;

— продължителност на периода на съхраняване на почвата и условия на съхранение (ако се съхранява).

Условия на изпитването:

— дати на провеждане на експериментите;

— приложено количество на изпитваното вещество;

— използвани разтворители и метод за апликиране на изпитваното вещество;

— тегло на първоначално третираната почва и на почвените проби при всеки интервал за анализ;

— описание на използваната инкубационна система;

— нива на въздушния поток (само за проточни системи);

— температура на експерименталната постановка;

— съдържание на влага в почвата през периода на инкубиране;

— микробна биомаса в началото, по време и в края на аеробните изпитвания;

— рН, концентрация на кислорода и редоксипотенциал в началото, по време и в края на анаеробните и изпитванията при наводняване;

— метод(и) на екстрахиране;

— методи за количествено определяне и идентифициране на изпитваното вещество и основните продукти от трансформацията в почва и абсорбционни материали;

— брой на репликите и брой на контролите.

Резултати:

— резултати от определянето на микробната активност;

— повторяемост и чувствителност на използваните аналитични методи;

— степени на възстановяване (% стойности за валиден експеримент са посочени в точка 1.7.1);

— таблици с резултати, изразени като процент от приложената първоначална доза и, където е подходящо, като mg.kg^{-1} почва (въз основа на сухо тегло);

— масов баланс по време и в края на изпитванията;

— охарактеризиране на неекстрахируемата (граничната) радиоактивност или остатъци в почвата;

— количествено определяне на отделения CO_2 и на други летливи съединения;

— диаграми на концентрациите в почвата спрямо времето за изпитваното вещество и, където е подходящо, за основните продукти от трансформацията;

— време на полуразпад или DT_{50} , DT_{75} и DT_{90} за изпитваното вещество и, където е подходящо, за основните продукти от трансформацията, включително доверителни интервали;

▼B

- оценка на степента на абиотично разграждане при стерилни условия;
- оценка на кинетиката на трансформацията на изпитваното вещество и, където е подходящо, на основните продукти от трансформацията;
- предлагани пътища на трансформация, където е подходящо;
- обсъждане и интерпретиране на резултатите;
- „сурови“ (необработени) данни (напр. хроматограми на пробите, примерни изчисления на степените на трансформация и използваните средства за идентифициране на продуктите от трансформацията).

4. ПРЕПРАТКИ

- (1) US Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (3) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.
- (4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4—1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
- (6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.
- (7) ISO 14239 (1997). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- (8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (9) MAFF — Japan 2000 — Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).
- (10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18—20 January 1995.
- (11) Guth, J. A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R. J. Hance, Ed.), Academic Press, 123—157.
- (12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).
- (13) T. R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945—956 (IUPAC 1984).
- (14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

▼B

- (15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (16) приложение V to Dir. 67/548/EEC.
- (17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In *Progress in Pesticide Biochemistry*. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85—114.
- (18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).
- (19) *Methods of Soil Analysis* (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) *Agronomy Series № 9*, 2nd Edition.
- (20) *Methods of Soil Analysis* (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keelney, Eds. *Agronomy Series № 9*, 2nd Edition.
- (21) *ISO Standard Compendium Environment* (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.
- (22) Мьккенhausen, E. (1975). *Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen*. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.
- (23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). *Lehrbuch der Bodenkunde*. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (24) Anderson, J. P. E., Domsch, K. H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10, 215—221.
- (25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.
- (26) Anderson, J. P. E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In *Pesticide Effects on Soil Microflora*. L. Somerville, M. P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.
- (27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and biotransformation of pesticides in aqueous environment. *Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide*, 105—120.
- (28) Keuken O., Anderson J. P. E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 59—63 (SETAC-Europe).
- (29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjudahl-Svensson K., Stenstrum J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 68—69 (SETAC-Europe).
- (30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. *Plant and Soil* 102, 197—200.
- (31) Anderson, J. P. E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. *Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII*, 141—146.

▼B

- (32) Hamaker, J. W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181—199.
- (33) Goring, C. A. I., Laskowski, D. A., Hamaker, J. W., Meikle, R. W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In „Environmental Dynamics of Pesticides“. R. Haque and V. H. Freed, Eds., 135—172.
- (34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, 188—204.
- (35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33, 47—60.
- (36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032—1041.
- (37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83—122.



Приложение 1

ВОДНО НАЛЯГАНЕ, ПОВЪРХНОСТЕН КАПАЦИТЕТ (FC) И СПОСОБНОСТ ЗА ЗАДЪРЖАНЕ НА ВОДА (WHC) ⁽¹⁾

Височина на водния стълб [cm]	pF ^(a)	bar ^(b)	Забележки
10 ⁷	7	10 ⁴	Суха почва
1,6 · 10 ⁴	4,2	16	Точка на сушене
10 ⁴	4	10	
10 ³	3	1	
6·10 ²	2,8	0,6	
3,3 · 10 ²	2,5	0,33 ^(c)	
10 ²	2	0,1	Обхват на повърхностния капацитет ^(d)
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (приближение)
1	0	0,001	Водооросявана почва

^(a) pF = log на cm воден стълб.

^(b) 1 bar = 10⁵ Pa.

^(c) Съответства на приблизително водно съдържание от 10 % в пясък, 35 % в почва и 45 % в глина.

^(d) Повърхностният капацитет не е константа, а варира с различните типове почва между pF 1,5 и 2,5.

Водното налягане се измерва в cm воден стълб или в bar. Във връзка с по-големия обхват на налягането на всмукване то се изразява просто като стойност на pF, която е еквивалентна на логаритъма от cm на водния стълб.

Повърхностният капацитет (FC) се определя като количеството вода, което може да бъде запазено 2 дни след по-дълъг дъждовен период или достатъчно напояване, спрямо притеглянето от естествената почва (в природата). Той се определя за необработена почва *in situ* на повърхността. Измерването е неприложимо за обработени лабораторно почвени проби. Стойностите на FC, определени при обработени почви, могат да покажат големи систематични отклонения.

Способността за задържане на вода (WHC) се определя в лабораторни условия с необработени и обработени почви чрез насищане на почвата в колоната с вода, пренасяна по капиларен път. Тя е особено важна при обработени почви и може да бъде до 30 % по-голяма от повърхностния капацитет (1). А така също експериментално по-лесно е да се определят такива достоверни стойности на FC.

⁽¹⁾ Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.



Приложение 2

**СЪДЪРЖАНИЕ НА ВЛАГА В ПОЧВАТА (g вода за 100 g суха почва) ПРИ
РАЗЛИЧНИТЕ ВИДОВЕ ПОЧВА ОТ РАЗЛИЧНИ СТРАНИ**

Тип почва	Страна	Съдържание на влага в почвата		
		WHC ⁽¹⁾	pF = 1,8	pF = 2,5
Пясък	Германия	28,7	8,8	3,9
Глинест пясък	Германия	50,4	17,9	12,1
Глинест пясък	Швейцария	44,0	35,3	9,2
Наносна почва	Швейцария	72,8	56,6	28,4
Глинеста почва	Бразилия	69,7	38,4	27,3
Глинеста почва	Япония	74,4	57,8	31,4
Пясъчна почва	Япония	82,4	59,2	36,0
Наносна почва	САЩ	47,2	33,2	18,8
Пясъчна почва	САЩ	40,4	25,2	13,3

(¹) Способност за задържане на вода.

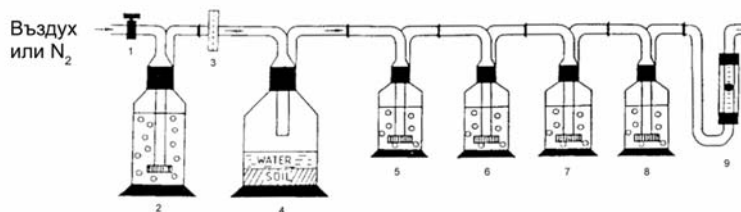
▼В

Приложение 3

Фигура 1

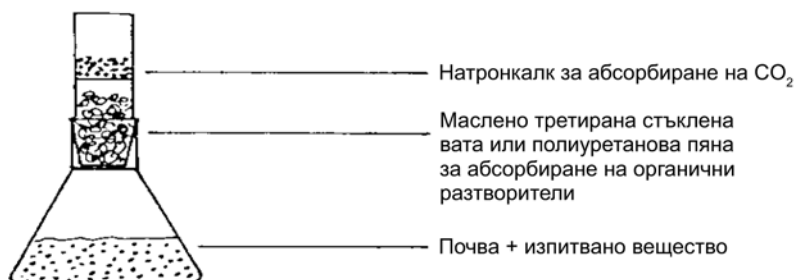
Пример за проточна апаратура за изследване на трансформацията на химикали в почва ⁽¹⁾ ⁽²⁾

- | | | |
|--|--|--|
| 1: иглен вентил | 4: колба за почвения метаболизъм (само при анаеробни и условия при наводняване;) | 6: сярна киселина за улавяне на алкални летливи съединения |
| 2: газопромиваща бутилка, съдържаща вода | 5: етилен гликол за улавяне на органични летливи съединения | 7, 8: натриев хидроксид за улавяне на CO_2 и други киселинни летливи съединения |
| 3: ултрамембрана (само при стерилни условия), с размер на порите 0,2 μm | 9: разходомер (дебитомер). | |



Фигура 2

Пример за биометричен вид колба за изследване на трансформацията на химикали в почва ⁽³⁾



⁽¹⁾ Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R. J. Hance, Ed.), Academic Press, 123—157.

⁽²⁾ Guth, J. A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry, D. H. Hutson, T. R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1,85—114.

⁽³⁾ Anderson, J. P. E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141—146.

▼B**В.24. АЕРОБНА И АНАЕРОБНА ТРАНСФОРМАЦИЯ ВЪВ
ВОДНИ СЕДИМЕНТНИ СИСТЕМИ****1. МЕТОД**

Този метод е идентичен с OECD TG 308 (2002).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Химикалите могат да попаднат в плитчините или дълбоко под водната повърхност по такива пътища на постъпване, като директно прилагане, впръскване, изливане, дренаж, депониране на отпадъци, промишлени, битови или земеделски отпадъчни води и атмосферно отлагане. Този метод за изпитване описва лабораторен метод за оценка на аеробната и анаеробната трансформация на органични химикали във водни седиментни системи. Той се основава на съществуващите ръководства (1) (2) (3) (4) (5) (6). Семинарът на ОИСП за избор на почви и седименти, проведен в Belgirate, Италия, през 1995 г. (7), приема конкретно броя и вида на седиментите, използвани при това изпитване. Той също дава препоръки, свързани със събирането, обработването и съхранението на седиментните проби, основани на Ръководството на ISO (8). Такива изпитвания се изисква да бъдат проведени за химикали, които директно се прилагат във водата или които има вероятност да достигнат водната среда по някой от описаните по-горе пътища.

Често условията в естествената водна седиментна система са аеробни в по-горната водна фаза. Повърхностният слой на седимента може да бъде или аеробен, или анаеробен, докато по-дълбокият седимент обикновено е анаеробен. За да се обхванат всички тези възможности, в този метод са описани и аеробни, и анаеробни изпитвания. Аеробното изпитване симулира аеробна водна колона над аеробен седиментен слой, който е с анаеробен градиент. Анаеробното изпитване симулира затворена анаеробна водноседиментна система. Ако обстоятелствата показват, че е необходимо значително отклонение от тези препоръки, например поради използване на цели седименти или седименти, които могат да бъдат експозирани с изпитваното вещество, за целта се използват други налични методи (9).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

При всички случаи трябва да бъдат използвани международните стандартни единици (SI).

Изпитвано вещество: всяко вещество, независимо от това дали е изходно съединение или съответен продукт от трансформацията.

Продукти от трансформацията: всички вещества, получени в резултат на реакциите при биотични и абиотични трансформации на изпитваното вещество, включително CO₂ и крайните остатъци.

Крайни остатъци: представляват съединения в почвата, растенията или животните, които остават в матрицата под формата на изходно вещество или негов(и) метаболит(и) след екстракциите. Методът за екстрахиране не трябва съществено да изменя самите съединения или структурата на матрицата. Би могло донякъде да се изясни природата на връзката чрез прилагане на екстракционни методи с промяна на матрицата и на сложни аналитични техники. Например по този начин се идентифицират ковалентни йонни и сорбционни връзки, а така също и включванията (примеси). Най-общо образуването на крайни остатъци намалява значително биологичния достъп и биологичната наличност (10) [изменено от IUPAC 1984(11)].

▼B

Аеробна трансформация: (окисление): реакциите протичат в присъствието на молекулен кислород (12).

Анаеробна трансформация: (редукция) реакциите протичат в отсъствието на молекулен кислород (12).

Природни води: са повърхностните води от езера, реки, потоци и др.

Седимент: е смес от минерални и органични химични инградиенти, които съдържат съединения с високо съдържание на въглерод и азот в тях и са с високи молекулни маси. Той се отлага от природните води и формира граница с тях.

Минерализация: е пълното разграждане на органично съединение до CO_2 и H_2O при аеробни условия и до CH_4 , CO_2 и H_2O при анаеробни условия. В контекста на този метод за изпитване, когато се използва съединение с маркиран радиоактивен изотоп, минерализация означава пълното разграждане на молекулата, по време на което маркиран въглероден атом се окислява или редуцира количествено, вследствие на което се отделя съответното количество $^{14}\text{CO}_2$ или съответно $^{14}\text{CH}_4$.

Време на полуразпад: $t_{0,5}$ е времето, при което е достигната 50 % трансформация на изпитвано вещество, когато трансформацията може да бъде описана чрез кинетика от първи клас; то не зависи от началната концентрация.

DT₅₀ (време на изчезване 50): е времето, за което началната концентрация на изпитваното вещество намалява с 50 %;

DT₇₅ (време на изчезване 75): е времето, за което началната концентрация на изпитваното вещество намалява със 75 %.

DT₉₀ (време на изчезване 90): е времето, за което началната концентрация на изпитваното вещество намалява с 90 %.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

За количествено определяне и идентифициране на продуктите от трансформацията трябва да бъдат използвани вещества за сравнение в съответните спектроскопски и хроматографски методи.

1.4. ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

За измерване на степента на трансформация могат да бъдат използвани немаркирани изпитвани вещества или такива с маркирани изотопи, въпреки че се предпочита маркиран материал. Необходимо е използването на маркиран материал за проследяване на пътя на трансформация и за установяване на масовия баланс. Препоръчва се маркиране ^{14}C , но употребата на други изотопи, такива като ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P , също може да бъде от полза. Доколкото е възможно, етикетът трябва да бъде поставен върху най-стабилната(ите) част(и) на молекулата⁽¹⁾. Изпитваното вещество трябва да бъде с химична и/или радиохимична степен на чистота минимум 95 %.

Преди провеждане на изпитване трябва да бъде осигурена следната информация за изпитваното вещество:

- а) разтворимост във вода (метод А.6)
- б) разтворимост в органични разтворители;
- в) парно налягане (метод А.4) и константата на Хенри;

⁽¹⁾ Например ако веществото съдържа един пръстен, се изисква маркиране на този пръстен; ако изпитваното вещество съдържа два или повече пръстена, за оценяване на „жизнения цикъл“ на всеки маркиран пръстен може да бъде необходимо провеждане на отделни изпитвания, за да се получи подходяща информация за образуването на продуктите от трансформацията.

▼B

- г) коефициент на съотношението п-октанол/вода (метод А.8);
- д) адсорбционен коефициент (K_d , K_f или K_{oc} , където е възможно) (метод В.18);
- е) хидролиза (метод В.7);
- ж) дисоциационна константа (pK_a) [Насоки на ОИСП 112] (13);
- з) химична структура на изпитваното вещество и положение на етикетирания(те) изотоп(и), ако има.

Забележка: Трябва да бъде отчетена температурата, при която са направени тези измервания.

Друга полезна информация може да включва данни за токсичността на изпитваното вещество към микроорганизмите, данни за действителната и/или наследствената способност за биоразграждане и данни за аеробната и анаеробната трансформация в почвата.

Трябва да има налични аналитични методи (включително методи за екстракция и почистване) за количествено определяне и идентифициране на изпитваното вещество и неговите продукти от трансформацията във вода и в седимент (вж. точка 1.7.2).

1.5. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Методът, описан в настоящото изпитване, използва аеробна и анаеробна водна седиментна система (вж. приложение 1), която позволява:

- i) измерването на нивото на трансформация на изпитваното вещество във водноседиментна система,
- ii) измерването на нивото на трансформация на изпитваното вещество в седимента,
- iii) измерването на степента на минерализация на изпитваното вещество и/или неговите продукти от трансформацията (когато се използва изпитвано вещество, маркирано с¹⁴C),
- iv) идентифициране и количествено определяне на продуктите от трансформацията във водната и седиментната фаза, в това число масов баланс (когато се използва маркирано вещество),
- v) измерването на разпределението на изпитваното вещество и неговите продукти от трансформацията между двете фази през периода на инкубиране на тъмно (да се избягват, например, цветове от морски водорасли) при постоянна температура. Стойностите на времената на полуразпадите, DT_{50} , DT_{75} и DT_{90} се определят, когато данните се потвърждават, но не трябва да бъдат екстраполирани дълго след експерименталния период (вж. точка 1.2).

Най-малко два седимента и свързаните с тях води са необходими за аеробните и респективно за анаеробните изпитвания (7). Въпреки това може да има случаи, при които да бъдат използвани повече от два водни седимента, например при химикал, който може да присъства в сладководни води и/или в морска среда.

▼B**1.6. ПРИЛОЖИМОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО**

Този метод е общоприложим за химичните вещества (немаркирани или маркирани), за които има аналитичен метод с достатъчна точност и чувствителност. Той е приложим за слабо-летливи, нелетливи, водоразтворими или слабо-разтворими във вода съединения. Изпитването не трябва да бъде прилагано за химикали, които при контакт с вода стават силно летливи (напр. опушващи средства, органични разтворители) и поради това не биха могли да бъдат запазени във водата и/или седимента при експерименталните условия на настоящото изпитване.

Методът се прилага и за проучване на трансформацията на химикалите в сладководни води и седименти, но по принцип също може да бъде приложен за естуарни/морски системи. Той не е подходящ за симулиране условията в течащи води (напр. реки) или открито море.

1.7. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО**1.7.1. Възстановяване**

Екстрахиране и анализиране на най-малко две водни и седиментни проби веднага след добавяне на изпитваното вещество дават първоначална индикация за повтаряемостта на аналитичния метод и за еднаквото прилагане на апликационната процедура при изпитваното вещество. Възстановяванията на по-късните етапи на експеримента се представят чрез съответните масови баланси (когато се използва маркиран материал). Възстановяванията трябва да бъдат в обхвата от 90 % до 110 % за маркирани химикали (6) и от 70 % до 110 % за немаркирани химикали.

1.7.2. Повтаряемост и чувствителност на аналитичния метод

Повтаряемостта на аналитичния метод (с изключение на първоначалната екстракционна ефективност) за количествено определяне на изпитваното вещество и продуктите от трансформацията може да бъде проверена чрез дублиращи се анализи на едни и същи водни или седиментни проби, които са били инкубирани достатъчно дълго време, за да се образуват продуктите от трансформацията.

Границата на аналитичния метод за откриване (LOD) на изпитваното вещество и на продуктите от трансформацията трябва да бъде поне $0,01 \text{ mg.kg}^{-1}$ във вода или в седимент (като изпитвано вещество) или 1 % от началното количество, приложено на системата за изпитване; разглежда се стойността, която е по ниска. Трябва да бъде определена също и границата за количествено определяне на метода (LOQ).

1.7.3. Прецизност на данните от трансформацията

Регресионният анализ на концентрациите на изпитваното вещество като функция от времето дава подходяща информация за надеждността (прецизността) на кривата на трансформация и позволява да се изчислят доверителните интервали на полу-разпада (ако се прилага псевдокинетика от първи клас или стойностите на DT_{50} и, ако е подходящо, стойностите на DT_{75} и DT_{90}).

1.8. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**1.8.1. Система и апаратура за изпитването**

Изпитването трябва да бъде провеждано в стъклени контейнери (напр. бутилки, центрофужни епруветки), освен ако предварително известната информация (такава като коефициента на съотношението n-октанол-вода, сорбционните данни и др.) показва, че изпитваното вещество може да се прилепи към стъклото, като в този случай трябва да се помисли за използване на алтернативен материал (като тефлон). Когато е известно, че изпитваното вещество прилепва към стъклото, може да е възможно за разрешаването на този проблем да се използват един или повече от следните методи:

▼B

- определяне на сорбираната от стъклото маса на изпитваното вещество и продуктите от трансформацията;
- осигуряване на разтворител за почистване на цялата стъклария в края на експеримента;
- използване на образуваните продукти (вж. също точка 1.9.2);
- използване на по-голямо количество съразтворител за добавяне на изпитвано вещество към системата; ако се използва съразтворител, той не трябва да солволизира изпитваното вещество.

Примери за типичната апаратура за изпитване, т.е. газопроточна и биометричен тип системи, са представени съответно в приложения 2 и 3 (14). Други инкулационни системи, които биха били от полза, са описани в позоваване 15. Дизайнът на експерименталната апаратура трябва да позволява обмена на въздух или азот и улавянето на летливите продукти. Размерите на апаратурата трябва да бъдат такива, че да отговарят на изискванията на изпитването (вж. точка 1.9.1). Вентилацията може да бъде осигурена или чрез лек барботаж (леко кипене), или чрез продухване с въздух или азот над водната повърхност. В друг случай леко разбъркване на водата може да бъде препоръчано за по-добро разпределение на кислорода или азота във водата. Свободният от CO₂ въздух не трябва да се използва, тъй като той може да причини като резултат нарастване на pH на водата. От друга страна, трябва да бъде избягвано въздействието върху седимента, доколкото е възможно. Слабо летливите химикали трябва също да бъдат изпитвани в биометричен тип система с леко разбъркване на водната повърхност. Може да се използват също затворени съдове, пространството в горната част на които е заето от атмосферен въздух или азот и от вътрешни ампули за улавяне на летливи продукти (16). При аеробно изпитване се изисква редовен обмен на газа в горното пространство, за да се компенсират консумацията на кислород от биомасата.

Подходящи уловители за събиране на летливите продукти от трансформацията включват, без да се ограничават до 1 mol.dm⁻³, разтвори на калиев хидроксид или натриев хидроксид за въглероден диоксид⁽¹⁾ и етилен гликол, етаноламин или 2% парафин в ксилен за органични съединения. Летливите съединения, образувани при анаеробни условия, като метан, могат да бъдат събрани, например чрез молекулни отсявания. Такива летливи съединения могат да бъдат изгаряни, например до CO₂, чрез преминаване на газа през кварцова тръба, напълнена с CuO при температура 900 °C и улавяне на образувания CO₂ в абсорбер с алкали (17).

Изисква се използването на лабораторен инструментариум за химичните анализи на изпитваното вещество (напр. газотечна хроматография (GLC), високоефективна течна хроматография (HPLC), тънкослойна хроматография (TLC), маспектрометрия (MS), газ-хроматография-маспектрометрия (GC-MS), течна хроматография-маспектрометрия (LC-MS), ядрено-магнитен резонанс (NMR) и други), включително системи за откриване на химикали с маркиран радиоактивен изотоп и немаркирани химикали, ако е подходящо. Когато се използва материал с маркиран радиоактивен изотоп, се изисква да има също течен сцинтилационен брояч (детектор) и окислител за горенето (за изгарянето на седиментни проби преди анализиране за радиоактивност).

Изисква се и друго подходящо стандартно лабораторно оборудване, стъклария, химикали и реагенти за физикохимични и биологични определяния (вж. таблица 1, точка 1.8.2.2).

⁽¹⁾ Тъй като тези алкални абсорбционни разтвори също абсорбират въглероден диоксид от вентилирания въздух и правят това чрез респирация при аеробни експерименти, на равни интервали от време те трябва да бъдат сменяни, за да се избегне тяхното насищане и поради това да се загуби тяхната абсорбционна способност.

▼ B1.8.2. **Избор и брой на водните седименти**

Местата за вземане на проби трябва да бъдат избрани в съответствие с целта на изпитването за всяка ситуация. За избраните места за вземане на проби трябва да бъде обстойно разгледана историята на възможните земеделски, промишлени или битови влияния (намети) и на насрещните води (водите срещу течението). Седиментите не трябва да бъдат използвани, ако са замърсени с изпитваното вещество или негови структурни аналози през предходните 4 години.

1.8.2.1. *Избор на седимент*

Обикновено за аеробни изпитвания се използват два седимента (7). Двата избрани седимента трябва да се различават по съдържание на органичен въглерод и структура. Единият седимент трябва да има високо съдържание на органичен въглерод (2,5—7,5 %) и дребнозърнеста (фина) структура, а другият седимент трябва да има ниско съдържание на органичен въглерод (0,5—2,5 %) и едрозърнеста структура. Обикновено разликата в съдържанието на органичен въглерод в седиментите трябва да бъде поне 2 %. „Дребнозърнеста (фина) структура“ се дефинира като съдържание на [глина + нанос] ⁽¹⁾ > 50 %, а „едрозърнеста структура“ се дефинира като съдържание на [глина + нанос] < 50 %. Разликата в съдържанието на [глина + нанос] при двата седимента обикновено трябва да бъде поне 20 %. В случаите, при които химикал може да бъде открит също в морски води, поне една от водноседиментните системи трябва да бъде от морски произход.

За стриктното провеждане на анаеробно изпитване трябва да бъдат взети като проби два седимента (включително асоциираните им води) от анаеробните зони на повърхностен водоизточник (7). И седиментната, и водната фаза трябва внимателно да бъдат обработвани и транспортирани в отсъствие на кислород.

Може да има други параметри, които да са важни при избора на седименти, като те се разглеждат за всеки отделен случай. Например рН обхващат на седиментите е важен за изпитвани химикали, за които трансформацията и/или сорбцията могат да бъдат зависими от рН. Върху рН зависимостта на сорбцията може да се въздейства чрез pK_a на изпитваното вещество.

1.8.2.2. *Охарактеризиране на водноседиментните проби*

Ключовите параметри, които трябва да бъдат измерени и отчетени (с препратка към избрания метод) и при водата, и при седимента, и етапът от изпитването, при който тези параметри са били определени, се резюмират в таблицата по-долу. За информация, в препратки (18) (19) (20) (21) са представени методи за определяне на тези параметри.

В допълнение, може да е необходимо да бъдат измерени и отчетени други параметри, определяни за всеки отделен случай (напр. за сладки води: частици, алкалност, твърдост, проводимост, NO_3/PO_4 (съотношение и индивидуални стойности); за седименти: способност за катионен обмен, способност за задържане на вода, карбонат, общи азот и фосфор; и за морски системи: соленост. Анализиране на седиментите и водите за нитрати, сулфонати, бионалично (биологично годно) желязо и други възможни електронни аксептори също може да бъде от полза при оценяването на окислително-редукционните условия, особено във връзка с анаеробната трансформация.

⁽¹⁾ [Глина + нанос] е минералната фракция на седимента с размер на частиците < 50 μm .


Измервания на параметрите за охарактеризиране на водноседиментните проби (7)(22)(23)

Параметър	Етап от процедурата за изпитване					
	място за вземане на пробите	последваща обработка	начало на аклиматизацията	начало на изпитването	по време на изпитването	край на изпитването
Вода						
Произход/източник	X					
Температура	X					
pH	X		X	X	X	X
ТОС			X	X		X
Концентрация на O ₂ *	X		X	X	X	X
Редоксипотенциал*			X	X	X	X
Седимент						
Произход/източник	X					
Дебелина на слоя	X					
pH		X	X	X	X	X
Разпределение на частиците по размер		X				
ТОС		X	X	X		X
Микробна биомаса (*)		X		X		X
Редоксипотенциал (**)	Наблюдения (цвет/мирис)		X	X	X	X

(*) Метод на микробиалното респираторно ниво (26), метод за опушване (27) или измервания чрез преброяване върху плочка (напр. бактерии, актиномицети, фунги и общо колонии) при аеробни изпитвания; степен на метаногенеза при анаеробни изпитвания.

(**) Последните резултати от научните изследвания показват, че измерванията на концентрациите на кислорода във вода и на редоксипотенциалите не са нито механистични, нито предвидими стойности, доколкото зависят от растежа и развитието на микробните популации в повърхностните води (24) (25). Определянето на биохимичната потребност от кислород (BOD, при вземането на повърхностни проби, в началото и края на изпитването) и на концентрациите на микро/макрохрани Ca, Mg и Mn (в началото и края на изпитването) във води и измерванията на общия N и общия P в седименти (при вземането на повърхностни проби и в края на изпитването) могат да бъдат по-добри инструменти за интерпретиране и оценка на нивата и пътищата на аеробна биотрансформация.

1.8.3. Събиране, обработване и съхранение
1.8.3.1. Събиране

При вземането на проби от седимент трябва да бъде използвано Проекторководството на ISO за вземане на проби от основата на седимента (8). Седиментните проби трябва да бъдат взети от целия по-горен слой на седимента на дълбочина от 5 до 10 cm. Асоциираната с него вода трябва да бъде събрана от същото място или местоположение и по същото време, както при седимента. За анаеробно изпитване пробите от седимент и асоциирана вода трябва да бъдат взети и транспортирани в отсъствие на кислород (28) (вж. точка 1.8.2.1). В позовавания (8) (23) са описани някои устройства за вземане на проби.

▼ B**1.8.3.2. Обработване**

Седиментът се отделя от водата чрез филтруване и във влажен вид се пресява през 2 mm сито чрез използване на допълнително добавена вода, която след това се отделя. Тогава определените количества седименти и вода се смесват в желаното съотношение (вж. точка 1.9.1) в инкубационните колби и се подготвят за аклиматизационния период (вж. точка 1.8.4). За анаеробно изпитване всички етапи на обработване трябва да бъдат провеждани в отсъствие на кислород (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. Съхранение

Силно се препоръчва употребата на пресни проби седимент и вода, но ако е необходимо съхранение, седиментът и водата трябва да бъдат пресети, както е описано по-нагоре, и съхранявани заедно (6 — 10 cm воден слой), на тъмно, при 4 ± 2 °C в продължение на максимум 4 седмици (7) (8) (23). Пробите, които ще бъдат използвани за аеробни изпитвания, трябва да бъдат съхранявани при свободен достъп на въздух (напр. в отворени контейнери), докато тези за анаеробно изпитване — в отсъствие на кислород. Не трябва да се допуска замръзване на седимента и водата и изсъхване на седимента по време на транспортирането и съхранението.

1.8.4. Подготовка на седиментните/водните проби за изпитването

Подготовката трябва да премине през период на аклиматизация, преди да се добави изпитваното вещество към всяка седиментна/водна проба, която е била поставена в инкубационен съд, да бъде използвана в основното изпитване и аклиматизацията да бъде проведена при точно спазване на същите условия, както при инкубирането за изпитването (вж. точка 1.9.1). Аклиматизационният период е времето, необходимо за достигане на приемлива стабилност на системата, което се отразява на рН, концентрацията на кислород във водата, редоксипотенциалите на седимента и водата и макроскопското разделяне на фазите. Периодът за аклиматизация обикновено трябва да продължи между една и две седмици и не трябва да превишава четири седмици. Резултатите от направените през този период определяния трябва да бъдат отчетени.

1.9. ПРОВЕЖДАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**1.9.1. Условия на изпитването**

Изпитването трябва да се провежда в инкубационна апаратура (вж. точка 1.8.1) при обемно съотношение вода-седимент между 3:1 и 4:1, и седиментен слой 2,5 cm ($\pm 0,5$ cm)⁽¹⁾. Препоръчва се минималното количество на седимента да е 50 g (сухо тегло) за инкубационен съд.

Изпитването трябва да се провежда на тъмно, при постоянна температура, в обхвата от 10 до 30 °C. Подходящата температура е (20 ± 2) °C. Когато е подходящо, при отделни случаи може да бъде приложена допълнителна по-ниска температура (напр. 10 °C), в зависимост от информацията, която следва да бъде осигурена от изпитването. Инкубационната температура трябва да бъде наблюдавана и отчитана.

⁽¹⁾ Последните изследвания показват, че съхранението при 4 °C може да доведе до намаляване на съдържанието на органичен въглерод в седимента, което има вероятност да доведе до понижаване на микробната активност (34).

▼B**1.9.2. Обработване и прилагане на изпитваното вещество**

Използва се една концентрация за изпитване на химикала ⁽¹⁾. При препаратите за защита на зърнените култури химикалите се прилагат директно чрез напоителните съоръжения, като се вземе предвид максималната доза, указана на етикета като максимално апликационно ниво, което е изчислено въз основа на повърхността (площта) на водата в съда за изпитване. При всички други случаи използваната концентрация трябва да се базира на предположенията за емисиите в околната среда. Трябва да се обърне внимание на осигуряването на подходящата концентрация на изпитваното вещество, която ще се приложи за охарактеризиране на пътя на трансформацията, и образуването и намаляването на продуктите от трансформацията. Може да се наложи да се приложат по-високи дози (напр. 10 пъти) в ситуации, при които концентрациите на изпитваното вещество са близки до границите на откриване в началото на експеримента и/или основните продукти от трансформацията не могат лесно да бъдат открити, при наличие на 10 % апликационно ниво на изпитваното вещество. Въпреки това, ако се използват по-високи концентрации, те не трябва да оказват значително вредно въздействие върху микробната активност на водноседиментната система. За да се постигне постоянна концентрация на изпитваното вещество в съдове с различни размери, може да бъде представено съответното уточнение за количеството приложен материал въз основа на дълбочината на водната колона в съда, във връзка с дълбочината на водата на повърхността (която се приема, че е 100 cm, но могат да се използват и други дълбочини). Вж. приложение 4 за примерно изчисление.

В идеалния случай изпитваното вещество трябва да бъде приложено като воден разтвор във водната фаза на изпитваната система. Ако е невъзможно да се избегне, се приема употребата в малки количества на водосмесими разтворители (такива, като ацетон, етанол) за апликиране и разпределение на изпитваното вещество, но те трябва да не надвишават 1 % об/об и не трябва да оказват вредно въздействие върху микробната активност на изпитваната система. Трябва да се внимава при приготвянето на водните разтвори на изпитваното вещество, за да се осигури пълно хомогенизиране, може да бъде подходящо използването на генериращи колони и предварително смесване. При следващо добавяне на водния разтвор в изпитваната система се препоръчва леко смесване на водната фаза, което, доколкото е възможно, да не засегне седимента.

Обикновено не се препоръчва употребата на образуваните продукти, тъй като образуваните съставки могат да повлияят на разпределението на изпитваното вещество и/или продуктите от трансформацията между водната и седиментната фаза. Въпреки това, при слаборазтворими във вода изпитвани вещества, употребата на образувания материал може да бъде подходяща алтернатива.

Броят на инкубационните съдове зависи от броя на пробните времена (вж. точка 1.9.3). В изпитването трябва да бъдат включени достатъчно на брой системи за изпитване, така че при всяко пробно време по две системи да могат да бъдат „пожертвани“. Когато се оставят контролни сектори във всяка водноседиментна система, те не трябва да бъдат третираны с изпитваното вещество. Контролните сектори могат да бъдат използвани за определяне на микробната биомаса на седимента и на общия органичен въглерод на водата и седимента при завършване на изпитването. Два от контролните сектори (т.е. един контролен сектор от всеки воден седимент) могат да бъдат използвани за наблюдение на изискваните параметри в седимента и водата по време на аклиматизационния период (вж. таблицата в точка 1.8.2.2). Трябва да бъдат включени два допълнителни контролни сектора за измерване на вредните въздействия върху микробната активност на изпитваната система, в случай че изпитваното вещество се прилага чрез разтворител.

⁽¹⁾ Провеждането на изпитване с втора концентрация може да бъде от полза при химикали, които попадат в повърхностните води чрез различни пътища на въвеждане, водещи до напълно различни концентрации, докато по-ниските концентрации могат да бъдат анализирани с достатъчна точност.

▼B**1.9.3. Продължителност на изпитването и вземане на проби**

Обикновено продължителността на експеримента не трябва да превишава 100 дни (6) и трябва да продължи до установяване на пътя на разграждане и модела на разпределение вода/седимент или когато 90 % от изпитваното вещество е разпръснато поради трансформация и/или летливост. Броят на пробните времена трябва да бъде най-малко шест (включително нулево време), като се провежда незадължително предварително изпитване (вж. точка 1.9.4), за да се установят подходящият режим на пробите и продължителността на изпитването, освен ако има достатъчно налични данни за изпитваното вещество от предишни изпитвания. За хидрофобни изпитвани вещества може да бъдат необходими допълнителни пробоотборни точки в началния период на изпитването, за да се определи степента на разпределение между водната и седиментната фаза.

При съответните пробни времена всички инкубационни съдове (с репликите) се изваждат за анализ. Седиментът и покриващата го вода се анализират поотделно⁽¹⁾. Повърхностната вода трябва внимателно да бъде отстранена при минимално въздействие върху седимента. Екстрахирането и охарактеризирането на изпитваното вещество и на продуктите от трансформацията трябва да следват подходящата аналитична процедура. Трябва да бъде обърнато внимание на отделянето на материала, който може да бъде адсорбиран от инкубационния съд, или на използваните свързващи тръби за улавяне на летливи съединения.

1.9.4. Възможно (незадължително) предварително изпитване

Ако продължителността и режимът за вземане на проби не могат да бъдат оценени по други съответстващи изследвания на изпитваното вещество, може да бъде сметено за подходящо провеждането на незадължително предварително изпитване, което трябва да бъде проведено при същите условия на изпитване както прилаганите в окончателното изпитване. Съответните експериментални условия и резултатите от предварителното изпитване, ако е проведено такова, трябва кратко да бъдат отчетени.

1.9.5. Измервания и анализи

Концентрацията на изпитваното вещество и на продуктите от трансформацията за всяко пробно време във водата и в седимента трябва да бъде измерена и отчетена (като концентрация и като процент на приложената). Най-общо, продуктите от трансформацията, открити при $\geq 10\%$ приложена радиоактивност върху цялата водноседиментна система, при всяко пробно време, трябва да бъдат идентифицирани, освен ако не е посочено разумно обяснение. Продуктите от трансформацията, чиито концентрации непрекъснато нарастват по време на изпитването, също трябва да бъдат отчетени за идентифициране, дори ако техните концентрации не надвишават посочените по-горе граници, тъй като това може да индикира за устойчивост. Последните трябва да бъдат отчитани за всеки отделен случай и да се посочат в протокола заедно със съответните обяснения.

Резултатите от системите за улавяне на газове/летливи съединения (CO_2 и други, т.е. летливи органични съединения) трябва да бъдат отчетени за всяко пробно време. Трябва да бъдат отчетени и степените на минерализация. Неекстрахируемите (крайните) остатъци в седимента също трябва да бъдат отчетени за всяка пробоотборна точка.

⁽¹⁾ В случаите, при които е възможно да се получи бързото преокисляване на продуктите от анаеробната трансформация, при вземането на проби и при анализирането трябва да бъдат поддържани анаеробни условия.

▼B**2. ДАННИ****2.1. ОБРАБОТВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Общият масов баланс или възстановяването (вж. точка 1.7.1) на допълнителната радиоактивност се изчислява за всяко пробно време. Резултатите трябва да бъдат отчетени като резултат от допълнителната радиоактивност. Разпределението на радиоактивността между водата и седимента трябва да бъде отчетено като концентрации и като проценти за всяко пробно време.

Времето за полуразпад, DT_{50} и, ако е подходящо, DT_{75} и DT_{90} на изпитваното вещество трябва самостоятелно да бъдат изчислени с техните доверителни интервали (вж. точка 1.7.3). Информация за степента на разсейване на изпитваното вещество във водата и в седимента може да бъде получена чрез използването на подходящи инструменти за оценка. Те могат да обхващат: прилагане на псевдокинетика от първи порядък, техники, свързани с емпиричната крива, които прилагат графични или цифрови решения, и използване на по-комплексни оценки, например едно- или многостъпални модели. Повече подробности могат да бъдат получени от съответната публикувана литература (35) (36) (37).

Всички подходи имат своите силни и слаби страни и са разнообразни по отношение сложността им. Основно положение (предпоставка за избор) на кинетиката от първи порядък може да бъде свръхрационализирането (прекомерното опростяване) на процесите на разграждане и разпределение, а когато е възможно, тя предоставя показател (степенна константа или на полуразпад), който е лесно разбираем и стойността му се получава чрез използването на симулационен модел и изчисления при предвидими концентрации в околната среда. Емпиричните подходи или линейните трансформации могат да доведат до по-добра връзка между кривите и данните, и следователно да позволят по-точно определяне на стойностите на времето за полуразпад, DT_{50} и, ако е подходящо, DT_{75} и DT_{90} . Използването на диференцирани константи обаче е ограничено. Степенните модели могат да създадат определени константни величини, които да са от полза при оценката на риска, описват степента на разграждане при различните степени и разпределението на химикала. Те трябва да бъдат използвани също при оценяване на степенните константи на образуване и разграждане на основните продукти от трансформацията. При всички случаи изборът на конкретния метод трябва да бъде обоснован и експериментаторът трябва графично и/или статистически да демонстрира преимуществата му.

3. ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Протоколът от изпитването трябва да включва следната информация:

Изпитвано вещество:

— търговско наименование, химично наименование, CAS номер, структурна формула (показваща положението на етикета(ите), когато се използва материал с маркиран радиоактивен изотоп) и съответните физикохимични свойства;

— степен на чистота (примеси) на изпитваното вещество;

— радиохимична степен на чистота на маркиран химикал и моларна активност (където е подходящо).

▼B

Вещества за сравнение:

- химично наименование и структура на веществата за сравнение, използвани за охарактеризиране и/или идентифициране на продуктите от трансформацията.

Изпитвани седименти и води:

- местоположение и описание на местата за вземане на водни седиментни проби, включително, ако е възможно, история на замърсяването;
- цялата информация, свързана със събирането, съхранението (ако има) и аклиматизирането на водноседиментните системи;
- характеристики на водноседиментните проби, както е посочено в таблицата от точка 1.8.2.2.

Условия на изпитването:

- използвана система за изпитване (напр. проточна, биометрична, начин на вентилация, метод за разбъркване, обем на водата, маса на седимента, дебелина на двата слоя – воден и седиментен, размери на съдовете за изпитване и др.);
- прилагане на изпитваното вещество в системата за изпитване: използвана концентрация за изпитване, брой на репликите и контролите, начин на прилагане на изпитваното вещество (напр. употреба на разтворител, ако има) и др.;
- инкубационна температура;
- времена на пробите;
- екстракционни методи и тяхната ефективност, както и аналитични методи и граници на откриване;
- методи за охарактеризиране/идентифициране на продуктите от трансформацията;
- отклонения от протокола за изпитването или условията на изпитването по време на експеримента.

Резултати:

- фигури със „сурови“ (необработени) данни от представителни анализи (всички „сурови“ данни трябва да бъдат съхранени в GLP-архив);
- повторяемост и чувствителност на използваните аналитични методи;
- степени на възстановяване (% стойности за валиден експеримент са посочени в точка 1.7.1);
- таблици с резултати, изразени като процент на приложената доза и в mg.kg^{-1} във вода, седимент и цялата система (само в проценти), на изпитваното вещество и, ако е подходящо, на продуктите от трансформацията и неекстрахируемата радиоактивност;
- масов баланс по време и в края на изпитванията;
- графично представяне на трансформацията във водната и седиментната фракция и в цялата система (включително минерализация);
- степени на минерализация;

▼B

- стойности на времето на полуразпад, DT_{50} и, ако е подходящо, на DT_{75} и DT_{90} за изпитваното вещество и, където е подходящо, за основните продукти от трансформацията, включително доверителни интервали във вода, седимент и в цялата система;
- оценка на кинетиката на трансформацията на изпитваното вещество и, където е подходящо, на основните продукти от трансформацията;
- предлагани пътища на трансформация, където е подходящо;
- обсъждане на резултатите.

4. ПРЕПРАТКИ

- (1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5—1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.
- (2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.
- (3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref № SC 9046. United-Kingdom.
- (4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada, pp 35—37.
- (5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162—3, Anaerobic aquatic metabolism.
- (6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.
- (7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18—20 January 1995.
- (8) ISO/DIS 5667—12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.
- (9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
- (10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
- (11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945—956 (IUPAC 1984).
- (12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).
- (13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- (14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, 149—158.

▼B

- (15) Guth, J. A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In *Progress in Pesticide Biochemistry* (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.
- (16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 631—637.
- (17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ¹⁴C-labelled model surfactants. *Water Research* 21, 661—667.
- (18) Black, C. A. (1965). *Methods of Soil Analysis*. Agronomy Monograph №. 9. American Society of Agronomy, Madison.
- (19) APHA (1989). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.
- (20) Rowell, D. L. (1994). *Soil Science Methods and Applications*. Longman.
- (21) Light, T. S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. *Anal. Chemistry* 44, 1038—1039.
- (22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop „A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests“, 3—4 July 1991.
- (23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8—10 November 1993. Eds.: I. R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.
- (24) Vink, J. P. M., van der Zee, S. E. A. T. M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. *Water Research* 31, 2858—2868.
- (25) Vink, J. P. M., Schraa, G., van der Zee, S. E. A. T. M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. *Environ. Toxicol.* 329—338.
- (26) Anderson, T. H., Domsch, K. H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. *Soil Biol. Biochem.* 17, 197—203.
- (27) ISO-14240-2. (1997). *Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method*.
- (28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. *Hydrobiol. Bull.* 24 (1), 13—21.
- (29) Shelton, D. R. and Tiedje, J. M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *App. Environ. Microbiol.* 47, 850—857.
- (30) Birch, R. R., Biver, C, Campagna, R., Gledhill, W. E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W. J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1527—1550.
- (31) Pagga, U. and Beimborn, D. B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. *Chemosphere* 27, 1499—1509.

▼B

- (32) Nuck, B. A. and Federle, T. W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ¹⁴C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3597—3603.
- (33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.
- (34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contam. Toxicol.* 58, 961—968.
- (35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. *Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer*, 39, 187—203.
- (36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. *Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer*, 33, 47—60.
- (37) Carlton, R. R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. *Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases*, pp 1349—1354.

*Приложение 1***РЪКОВОДСТВО ЗА АЕРОБНИ И АНАЕРОБНИ СИСТЕМИ ЗА ИЗПИТВАНЕ****Аеробна система за изпитване**

Аеробната система за изпитване, описана в настоящия метод, се състои от аеробен воден слой (обикновено концентрациите на кислород са в обхвата от 7 до 10 mg.l⁻¹) и седиментен слой, аеробен на повърхността и анаеробен под повърхността (обикновено средната стойност на редоксипотенциала (E_h) в анаеробната зона на седимента е в обхвата от – 80 до – 190 mV). Над повърхността на водата във всяка инкубационна единица преминава влажен въздух, за да се поддържа достатъчно количество кислород в горното пространство.

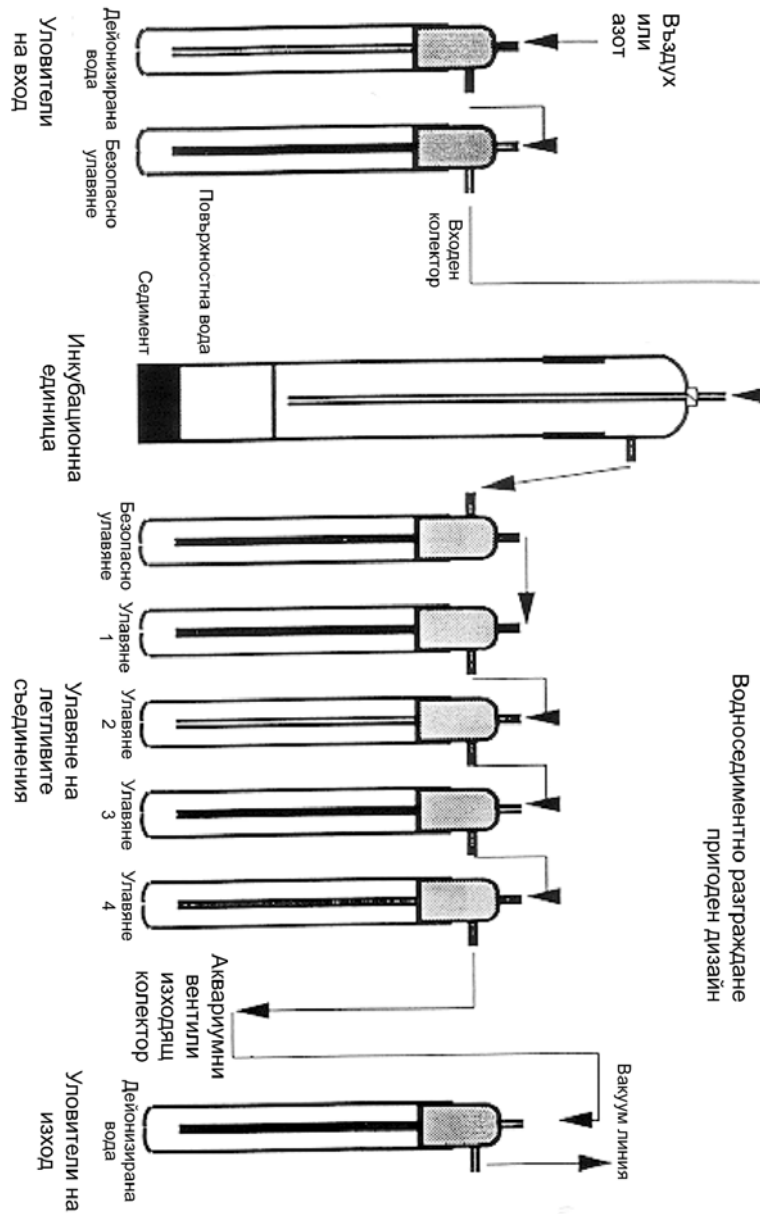
Анаеробна система за изпитване

При анаеробната система за изпитване процедурата за изпитване основно е същата както тази, изложена за аеробната система за изпитване, с изключение на това, че над повърхността на водата във всяка инкубационна единица преминава влажен азот, за да се поддържа достатъчно количество азот в горното пространство. Седиментът и водата се разглеждат като анаеробни, щом редоксипотенциалът (E_h) е по-нисък от – 100 mV.

При анаеробно изпитване оценката на минерализацията включва измерване на отделените въглероден диоксид и метан.

Приложение 2

ПРИМЕР ЗА ГАЗОПРОТОЧНА АПАРАТУРА



Безопасно улавяне - празен уловител

Улавяне 1:

етилен гликол за улавяне на органични летливи съединения

Улавяне 2:

сярна киселина 0,1M за улавяне на алкални летливи съединения

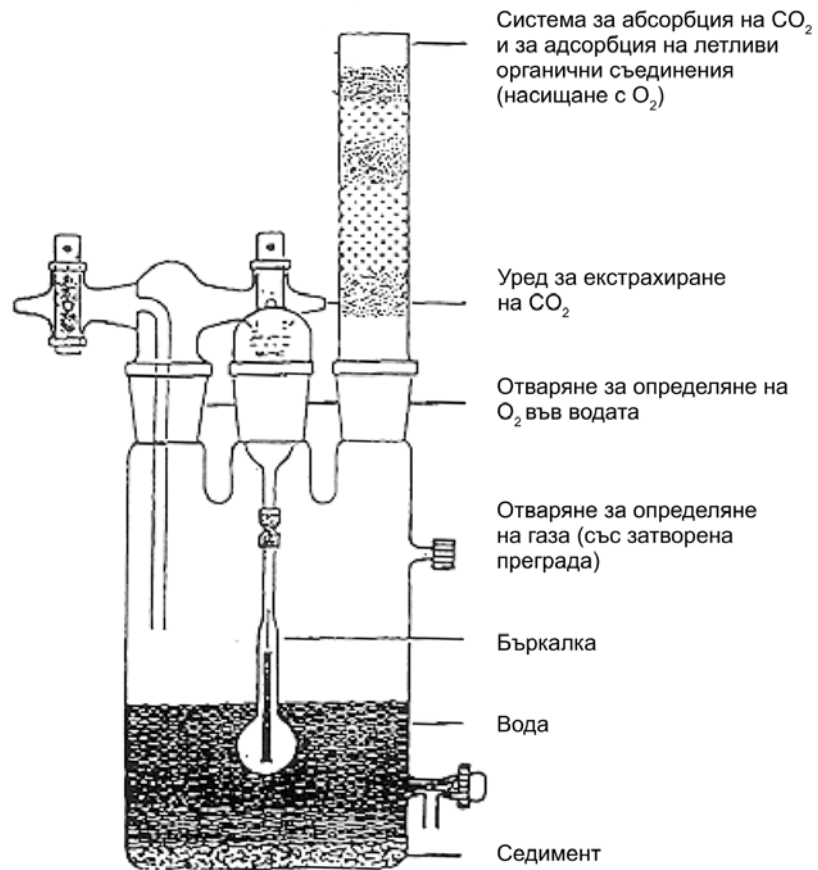
Улавяне 3:

натриев хидроксид 2M за улавяне на въглероден диоксид и други летливи съединения

▼B

Приложение 3

ПРИМЕР ЗА БИОМЕТРИЧНА АПАРАТУРА



Магнитна бъркалка

*Приложение 4***ПРИМЕРНО ИЗЧИСЛЕНИЕ НА АПЛИКАЦИОННАТА ДОЗА ЗА СЪДОВЕТЕ ЗА ИЗПИТВАНЕ**

Вътрешен диаметър на цилиндъра:	= 8 cm
Дълбочина на водната колона, несъдържаща седимент:	= 12 cm
Повърхностна площ: $3,142 \times 4^2$	50,3 cm ²
Апликационно ниво: 500 g изпитвано вещество/ha съответстват на 5 µg/cm ²	
Общо µg: $5 \times 50,3$	= 251,5 µg
Пригодено количество към дълбочина 100 cm:	
$12 \times 251,5 \div 100$	= 30,18 µg
Обем на водната колона: $50,3 \times 12$	= 603 ml
Концентрация във вода: $30,18 \div 603$	= 0,050 (µg/ml или 50 µg/l)

▼ **M1****В.25. АЕРОБНА МИНЕРАЛИЗАЦИЯ В ПОВЪРХНОСТНИ ВОДИ
— СИМУЛАЦИОННО ИЗПИТВАНЕ ЗА БИОРАЗГРАЖДАНЕ****1. МЕТОД**

Този метод е еквивалентен на ОИСП TG 309 (2004)

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Целта на това изпитване е измерването на продължителността на биоразграждането на изпитвано вещество при ниска концентрация в аеробна природна вода и количествена оценка на наблюденията под формата на кинетични уравнения. Това симуляционно изпитване представлява лабораторно серийно изпитване в колба, което има за цел определяне степента на биоразграждане на органични вещества чрез изследване на проби от природни повърхностни води (прясна, полусолена или морска). То се базира на ISO/DIS 14592—1 (1), като включва и елементи от методите на изпитване С.23 и С.24 (2)(3). По избор, при голяма продължителност на времето за изпитванията серийният способ се заменя с полунепрекъсваем, с цел да се предотврати влошаването на микросистемата за изпитване. Основната цел на симуляционното изпитване е определянето на минерализацията на изпитваното вещество в повърхностна вода, а минерализацията служи като основа за изразяването на кинетиката на разграждането. При все това, изпитването има и една второстепенна незадължителна цел — да се получи информация за първичното разграждане и за формирането на основните продукти от трансформацията. Идентифицирането на продуктите на трансформацията и, по възможност, определяне на концентрациите им са особено важни в случая на вещества, които се минерализират много бавно (напр. с период на полуразпад за общ остатъчен ^{14}C , надхвърлящ 60 дни). Поради аналитични ограничения, за идентифициране и количествена оценка на основните продукти на трансформацията, обикновено би следвало да се използват по-високи концентрации на изпитваното вещество (напр. > 100 µg/l).

При това изпитване ниска концентрация означава концентрация (напр. по-малка от 1 µg/l до 100 µg/l), която е достатъчно ниска, за да гарантира, че кинетиката на биоразграждането, получена при изпитването, отразява тази, която се очаква в околната среда. Сравнено с общата маса на биоразградими въглеродни субстрати, налични в природната вода, използвана в изпитването, изпитваното вещество с ниска концентрация ще послужи като вторичен субстрат. Това предполага, че очакваната кинетика на биоразграждане е от първи порядък („ненарастваща“ кинетика), както и че изпитваното вещество може да бъде разградено чрез „кометаболизъм“. Кинетиката от първи порядък означава, че скоростта на разграждане (mg/L/ден) е пропорционална на концентрацията на субстрата, която намалява с времето. При същинската кинетика от първи порядък специфичната константа на скоростта на разграждане — k не зависи от времето и концентрацията, т.е. k не се изменя осезаемо по време на експеримента и не се влияе от добавената концентрация между отделните експерименти. По дефиниция специфичната константа на скоростта на разграждане е равна на относителната промяна на скоростта във времето: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Макар и при зададените условия обикновено се очаква кинетика от първи порядък, възможно е наличието на определени обстоятелства, при които да е по-подходяща друг вид кинетика. Отклонения от кинетика от първи порядък могат да се наблюдават, например ако проявата на масов трансфер, какъвто е скоростта на дифузия, вместо да ограничи скоростта на биологична реакция, ограничава скоростта на биотрансформация. Въпреки това, данните почти винаги могат да бъдат описани чрез кинетика от псевдо-първи порядък, приемайки зависима от концентрацията константа на скоростта.

▼ M1

Информация за биоразграждането на изпитваното вещество при по-високи концентрации (напр. от стандартни скрининг изпитвания), както и информация за абиотичната биоразградимост, продуктите на трансформацията и съответните физико-химични свойства, следва да бъде налична преди започване на изпитването, за да се подпомогне планирането на експеримента и интерпретирането на резултатите. Използването на маркирани с ^{14}C изпитвани вещества и определянето на фазовото разпределение на ^{14}C в края на изпитването позволяват установяването на пълната биоразградимост. При използване на немаркирани изпитвани вещества пълната биоразградимост може да бъде установена единствено при изпитване на по-високи концентрации и ако са известни всички основни продукти на трансформацията.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Първично биоразграждане: Структурната промяна (трансформация) на химичното вещество под влияние на микроорганизми, в резултат на което настъпва загуба на химичната природа.

Функционално биоразграждане: Структурната промяна (трансформация) на химично вещество под влияние на микроорганизми, в резултат на което настъпва загуба на определено свойство.

Пълно аеробно биоразграждане: Разпадането на дадено химично вещество под действието на микроорганизми в присъствието на кислород до въглероден диоксид, вода и минерални соли на други налични елементи (минерализация) и производството на нова биомаса и органични продукти на микробна биосинтез.

Минерализация: Разлагането на дадено химично вещество или органична материя под действието на микроорганизми и при наличието на кислород до въглероден диоксид, вода и минерални соли на някакви други налични елементи.

Латентен период: Периодът от началото на изпитването до момента на адаптация на разлагашите се микроорганизми и на осезаемо увеличаване на степента на биоразграждане на дадено химично вещество или органична материя (напр. 10 % от максималното теоретично биоразграждане или по-нисък процент, в зависимост от точността на метода за измерване).

Максимална степен на биоразграждане: Степента на биоразграждане на дадено химично вещество или органична материя по време на изпитване, измерена в проценти, над която не се наблюдава допълнително биоразграждане в рамките на изпитването.

Първичен субстрат: Съвкупност от естествен въглерод и енергийни източници, осигуряващи растеж и поддържане на микробна биомаса.

Вторичен субстрат: Субстратна съставка, налична в толкова ниска концентрация, че при нейното биоразграждане на съответните микроорганизми се доставят незначителни количества въглерод и енергия, в сравнение с въглерода и енергията, получени при разграждането на основните субстратни съставки (първични субстрати).

Скоростна константа на разграждане: Скоростна константа от първи порядък или псевдо-първи порядък k (d^{-1}), показва скоростта на процесите на разграждане. При серийните експерименти k се изчислява от началната част на кривата на разграждане, получена след края на латентната фаза.

▼ M1

Период на полуразпад, $t_{1/2}$ (d): Термин, използван за характеризиране на скоростта на реакция от първи порядък. Представява интервала от време, съответстващ на двукратно намаляване на концентрацията. Полуразпадът и скоростната константа на разграждане са свързани чрез уравнението $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Период на полуразграждане, DT_{50} (d): термин, използван за количествено определяне на резултата от изпитванията за биоразграждане. Представява интервала от време, включително и латентната фаза, който е необходим за достигането на стойност на биоразграждане от 50 %.

Граница на откриваемост (LOD) и граница на количествено определяне (LOQ): Границата на откриваемост (LOD) представлява концентрацията на дадено вещество, под която видът на веществото не може да бъде разграничен от аналитични продукти. Границата на количествено определяне (LOQ) представлява концентрацията на дадено вещество, под която концентрацията не може да бъде установена с приемлива точност.

Разтворен органичен въглерод (DOC): Опази част от органичния въглерод във водна проба, която не може да бъде отделена чрез определеното фазово разделяне, например чрез центрофугиране при $40\,000\text{ ms}^{-2}$ в продължение на 15 минути или чрез мембранно филтриране, използвайки мембрани с отвори с диаметър $0,2\ \mu\text{m}$ — $0,45\ \mu\text{m}$.

Активност на общия органичен ^{14}C (TOA): Общата активност на органичен ^{14}C , свързана с органичния въглерод.

Активност на разтворения органичен ^{14}C (DOA): Общата активност на ^{14}C , свързана с разтворения органичен въглерод.

Активност на органичен ^{14}C под формата на твърди частици (POA): общата активност на ^{14}C , свързана с органичния въглерод под формата на твърди частици.

1.3. ПРИЛОЖИМОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

Симулационното изпитване е приложимо за нелетливи или слабо летливи органични вещества, изпитвани при ниски концентрации. При използването на отворени колби в контакт с атмосферата (напр. със запушалки от вата), веществата с константи по закона на Хенри под около $1\ \text{Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ (приблиз. $10^{-5}\ \text{atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$) могат да се считат за практически нелетливи. При използването на затворени колби за парофазов анализ е възможно изпитването на слабо летливи вещества (с константа по закона на Хенри $< 100\ \text{Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ или $< 10^{-3}\ \text{atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$) без загуби от системата за изпитване. Загуба на вещества, маркирани с ^{14}C , може да възникне, ако не се вземат съответните предпазни мерки, при отстраняването на въглероден диоксид. В такива ситуации може да се наложи улавянето на въглеродния диоксид във вътрешен абсорбер с основа или използването на външна абсорбционна система за въглероден диоксид (директно определяне на $^{14}\text{CO}_2$; вж. 3). За определянето на кинетиката на биоразграждането концентрациите на изпитваното вещество трябва да бъдат под степента на неговата водоразтворимост. Въпреки това, следва да се отбележи, че данните от научни източници за водоразтворимостта могат да са значително по-високи от разтворимостта на изпитваното вещество в природни води. По избор може да бъде установена разтворимостта на особено слабо водоразтворими изпитвани вещества, като се използват изпитваните природни води.

Методът може да бъде използван за симулиране на биоразграждане в повърхностни води без наличие на груби частици (пелагично изпитване) или в мътна повърхностна вода, която примерно може да се намира в близост до воден/седиментен обект (изпитване със суспендирани утайки).

▼ M1

1.4. ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

Изпитването се провежда на серии чрез инкубиране на изпитваното вещество или само с повърхностна вода (пелагично изпитване), или с повърхностна вода с наличие на суспендирани неразтворени вещества/утайки със сухо вещество от 0,01 до 1 g/l (изпитване със суспендирани утайки) с цел да се симулира воден обект със суспендирани неразтворени вещества или ресуспендирани утайки. За повечето повърхностни води е типично концентрацията на суспендираните неразтворени вещества/утайки да попада в долната част на този интервал. Колбите за изпитване се инкубират на тъмно при температура като на околната среда, при аеробни условия и с раеклащане. За определянето на кинетиката на разграждане е необходимо използването на най-малко две различни концентрации на изпитваното вещество. Концентрациите трябва да се различават помежду си от 5 до 10 пъти и трябва да отразяват очаквания диапазон на концентрации в околната среда. Максималната концентрация на изпитваното вещество не трябва да надвишава 100 µg/L, но максимални концентрации на изпитване под 10 µg/L или по-ниски са предпочитани с оглед обезпечаване на кинетика на биоразграждане от първи порядък. Най-ниската концентрация не трябва да превишава 10 µg/L, но се предпочитат минимални концентрации на изпитване от 1—2 µg/L или по-ниски от 1 µg/L. Обикновено задоволителен анализ на подобни ниски концентрации може да бъде постигнат чрез използването на предлагани в търговската мрежа вещества, маркирани с ¹⁴C. Поради аналитични ограничения често е невъзможно да се измери концентрацията на вещество с изискваната точност, ако изпитваното вещество се използва в концентрация ≤ 100 µg/L (вж. втора алинея от раздел 1.7.2). По-високи концентрации на изпитваното вещество (> 100 µg/L и понякога > 1 mg/L) могат да се използват за идентифициране и количествено определяне на основните продукти на трансформация или при липсата на специфичен метод за анализ с ниска граница на откриваемост. При изпитване на вещества при високи концентрации може да се окаже невъзможно използването на резултатите за изчисляване на константата на разграждане от първи порядък и периода на полуразпад, тъй като разграждането вероятно няма да протича по кинетичен модел от първи порядък.

Процесът на разграждане се наблюдава през определени интервали от време, измервайки или остатъчния ¹⁴C, или остатъчната концентрация на изпитваното вещество, при използването на специфичен химичен анализ. Маркирането на най-стабилната част от молекулата с ¹⁴C осигурява определянето на общата минерализация, докато маркирането с ¹⁴C на по-нестабилната част от молекулата, както и използването на специфичен анализ позволява оценката единствено на първичното биоразграждане. Въпреки това, най-стабилната част не включва непременно съответната функционална група на молекулата (която може да е свързана със специфични свойства като токсичност, биоакмулиране и др.). В такъв случай по-подходящо би било използването на маркирано с ¹⁴C изпитвано вещество във функционалната му част с цел да се проследи елиминирането на специфичното свойство.

1.5. ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНОВОТО ВЕЩЕСТВО

За това изпитване могат да бъдат използвани както радиомаркирани, така и немаркирани изпитвани вещества. Препоръчва се методът за маркировка с ¹⁴C, като обикновено маркировката трябва да става в най-стабилната(ите) част(и) на молекулата (вж. също раздел 1.4). При вещества, които съдържат повече от един ароматен пръстен, е за предпочитане един или два въглеродни атома във всеки пръстен да бъдат маркирани с ¹⁴C. В допълнение към това, за предпочитане е един или повече въглеродни атома от двете страни на лесно разпадащи се връзки да са маркирани с ¹⁴C. Химичната и/или радиохимичната чистота на изпитваното вещество трябва да бъдат > 95 %. За радиомаркирани вещества е за предпочитане специфична активност от приблизително 50 µCi/mg (1,85 MBq) или повече с цел да се улесни измерването на ¹⁴C при изпитвания, провеждани при ниски първоначални концентрации. Трябва да е налична следната информация за изпитваното вещество:

▼ M1

- разтворимост във вода [метод A.6];
- разтворимост в органичен(ни) разтворител(и) (вещества, използвани с разтворители, или вещества с ниска водоразтворимост);
- дисоциационна константа (pKa), ако веществото е склонно към протониране или депротониране [ОИСП TG 112] (4);
- парен натиск [метод A.4] и константа по закона на Хенри;
- химична стабилност във вода и на тъмно (хидролиза) [метод C.7].

Когато вещества с ниска водоразтворимост се изпитват в морска вода, полезно би било да се разполага с информация за константата на обезсоляване (или константата „Setschenow“) K^S , която се определя от следното уравнение: $\log(S/S') = K^S C_m$, където S и S' са разтворимостите на веществото съответно в прясна вода и в морска вода, а C_m е моларната концентрация на солта.

Ако изпитването се провежда като „изпитване със суспендирани утайки“ трябва да се разполага и със следната информация:

- коефициент на разпределение n-октанол/вода [метод A.8];
- коефициент на адсорбция [метод C.18].

Друга полезна информация включва:

- концентрация в околната среда, ако е известна или изчислена;
- токсичност на изпитваното вещество спрямо микроорганизми [метод C.11];
- пряка и/или присъща биоразградимост [методи C.4 A—F, C.12, C.9, ОИСП TG 302 (4)];
- аеробна или анаеробна биоразградимост в почва и изследвания на преобразуването утайка/вода [методи C.23, C.24].

1.6. РЕФЕРЕНТНО ВЕЩЕСТВО

Като референтно вещество трябва да бъде използвано такова, което обикновено се разгражда лесно при аеробни условия (напр. анилин или натриев бензоат). Обикновено очакваният период на разграждане на анилина и на натриевия бензоат е под 2 седмици. Предназначението на референтното вещество е да осигури микробиална активност на водата за изпитване е в рамките на определени граници; т.е. наличието на активна микробиална популация във водата.

▼ M1**1.7. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО****1.7.1. Възстановяване**

Веднага след добавянето на изпитваното вещество всяка първоначална изпитвана концентрация трябва да бъде проверявана чрез измерване на активността на ^{14}C или в случая с немаркирани вещества — чрез химични анализи, използвайки най-малко две проби. По този начин се добива информация за приложимостта и повторимостта на аналитичния метод, както и за хомогенността в разпределянето на изпитваното вещество. Обикновено за последващите анализи на данните се използва измерената първоначална активност ^{14}C или концентрацията на изпитваното вещество, а не номиналната концентрация, тъй като по този начин се компенсират загубите в резултат на грешки при сорбцията и дозирането. При маркирани с ^{14}C изпитвани вещества степента на възстановяване в края на експеримента се определя от тегловния баланс (вж. последната алинея от раздел 1.8.9.4). В идеалния случай маркираният като радиоактивен тегловен баланс трябва да е в диапазона от 90 % до 110 %, докато аналитичната точност би следвало да осигури първоначално възстановяване от порядъка на 70—110 % по отношение на немаркирани изпитвани вещества. Тези диапазони трябва да бъдат разбирани като цели и не трябва да се използват като критерии за приемане на изпитването. По избор аналитичната точност може да бъде определена за изпитваното вещество при по-ниска концентрация от първоначалната, както и за основните продукти на трансформацията.

1.7.2. Повторимост и чувствителност на аналитичния метод

Повторимостта на аналитичния метод (включително и ефективността на първоначалната екстракция) за количествено определяне на изпитваното вещество, както и продуктите на трансформацията, ако е уместно, трябва да се проверят чрез пет анализа на репликати от отделните пробовземания от повърхностните води.

Границата на откриваемост (LOD) при аналитичния метод по отношение на изпитваното вещество и на продуктите на трансформацията трябва да бъде най-малко 1 % от първоначалното количество, използвано в системата за изпитване, ако е възможно. Границата на количествено определяне (LOQ) трябва да е равна на или по-малка от 10 % от използваната концентрация. Химичните анализи на редица органични вещества и техните продукти на трансформация често изискват изпитваното вещество да се прилага в относително висока концентрация, т.е. > 100 µg/L.

1.8. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ**1.8.1. Оборудване**

Изпитването може да се извърши в конусовидни или цилиндрични колби с подходяща вместимост (напр. 0,5 или 1,0 литра), затворени със силиконови или гумени запушалки, както и в серумни колби, с непрпусащи CO_2 капачки (напр. с мембрана от бутиленов каучук). Друг вариант е извършване на изпитването при използването на няколко колби и изследване на целите колби, най-малко по две идентични, при всеки интервал на вземане на проби (вж. последната алинея от раздел 1.8.9.1). При нелетливи изпитвани вещества, които не са радиомаркирани, не се изисква използването на газонепропусащи тапи или капачки; за целта са подходящи тапи от памук, които предпазват от замърсители във въздуха (вж. втора алинея от раздел 1.8.9.1). Слабо летливите вещества трябва да бъдат изпитвани в система от биометричен тип при леко разбъркване на повърхността на водата. С цел по-сигурно предпазване от бактериално замърсяване, по желание стъклените съдове могат да бъдат стерилизирани преди употреба чрез загряване или автоклавиране. В допълнение към това се използва следното стандартно лабораторно оборудване:

— вибрационен плот или магнитни бъркалки за продължително разбъркване на колбите за изпитване;

▼ M1

- центрофуга;
- рН-метър;
- турбидиметър за измерване на мътност;
- пещ или микровълнова пещ за определяне на сухото вещество;
- апаратура за мембранно филтриране;
- автоклав или пещ за топлинна стерилизация на стъкленици;
- уреди за обработка на вещества, маркирани с ^{14}C ;
- оборудване за количествено определяне на ^{14}C активността в проби от улавящи CO_2 разтвори и, ако е необходимо, в проби от утайки;
- аналитично оборудване за определянето на изпитваното (и на референтното) вещество, в случай че се използва специфичен химичен анализ (напр. газов хроматограф, течен хроматограф с високо налягане).

1.8.2. Изходни разтвори на изпитвани вещества

За приготвяне на изходни разтвори на изпитвани и референтни вещества се използва дейонизирана вода (вж. първа алинея от раздел 1.8.7). Дейонизираната вода не трябва да съдържа вещества, които са токсични за микроорганизми, а разтвореният органичен въглерод (DOC) не трябва да надвишава 1 mg/L (5).

1.8.3. Вземане и транспортиране на проби от повърхностна вода

Мястото за вземане на проба от повърхностна вода трябва да бъдат избирани в съответствие с целта на изпитването за всеки отделен случай. При избора на места за вземане на проби трябва да се вземе под внимание информация за евентуални предишни земеделски, промишлени или битови въздействия. Ако е известно, че дадена водна среда е била замърсена с изпитваното вещество или с негови структурни аналози в рамките на последните четири години, тя не трябва да се използва за вземане на проби, освен ако изследователят няма за изрична цел проучването на скоростите на разграждане в замърсени в миналото обекти. На мястото на вземане на пробата трябва да се измери показателят рН и температурата на водата. Нещо повече, дълбочината на вземане на пробата и видът на водната проба (напр. цвят и мътност) трябва да бъдат отчетени (вж. раздел 3). Концентрацията на кислород и/или редоксипотенциалът във вода и в повърхностния седиментен слой трябва да бъдат измерени с цел демонстриране на аеробните условия, освен ако те не се подразбират от външния вид и наличната информация за обекта. Повърхностната вода трябва да бъде транспортирана в основно почистен контейнер. По време на транспортирането температурата на пробата не трябва да надвишава значително температурата, при която се провежда изпитването. Ако времето за транспортиране на водните проби надвиши 2 до 3 часа, се препоръчва охлаждане до 4 °C. Водната проба не трябва да бъде замръзнала.

▼ M1**1.8.4. Съхранение и подготовка на повърхностната вода**

За предпочитане е изпитването да започне в рамките на един ден след вземане на пробата. Съхранението на водата, ако то е необходимо, трябва да бъде сведено до минимум и при всички случаи не трябва да надвишава 4 седмици. Водната проба трябва да бъде съхранявана при температура от 4 °C и аерация до момента на нейното използване. Преди употреба грубите частици трябва да бъдат отстранени, например чрез филтрация през найлонов филтър с размер на отворите около 100 µm или през груба филтърна хартия, или пък чрез утаяване.

1.8.5. Подготовка на вода заедно с утайка (по избор)

При извършване на изпитването със суспендирани утайки към колбите, съдържащи природна вода (филтрирана според указанията на раздел 1.8.4 с цел отстраняване на грубите частици), се добавя повърхностна утайка с цел получаване на суспензия; концентрацията на суспендираните неразтворени вещества трябва да бъде между 0,01 и 1 g/L. Повърхностната утайка трябва да произлиза от същия място, от което е взета водната проба. В зависимост от особеностите на водната среда, повърхностната утайка може да се характеризира или с високо съдържание на въглерод (2,5 — 7,5 %) и с фина текстура, или с ниско съдържание на въглерод (0,5 — 2,5 %) и с груба текстура (2). Повърхностната утайка може да се подготви по следния начин: извлекете няколко утаечни ядки, използвайки тръбичка от прозрачна пластмаса, изрежете горните аеробни слоеве (от повърхността до дълбочина от около максимум 5 mm) веднага след вземането на пробите и ги съберете заедно. Формираната по този начин проба от утайка трябва да бъде транспортирана в контейнер с голямо свободно въздушно пространство с цел осигуряване на аеробни условия за утайката (охладете до 4 °C, ако транспортирането ще продължи повече от 2–3 часа). Пробата от утайката трябва да бъде суспендирана във водата за изпитване в съотношение 1:10 и съхранявана при температура от 4 °C и аерира до момента на използване. Съхраняването на утайката, ако е необходимо, трябва да бъде сведено до минимум и при всички случаи не трябва да надвишава 4 седмици.

1.8.6. Полунепрекъснатата процедура (по избор)

Може да бъде необходима продължителната инкубация (няколко месеца), ако има дълъг латентен период преди да е възможно измерването на значително разграждане на изпитваното вещество. Ако тази информация е налична от предходни изпитвания на веществото, изпитването може да бъде иницирано чрез използването на полунепрекъснат способ, който позволява периодичното подновяване на част от водата за изпитване или суспензията (вж. допълнение 2). Алтернативно, нормалното серийно изпитване може да бъде премине в полунепрекъснатото, ако в рамките на приблизително 60 дни на изпитване чрез серийен способ не е настъпило никакво разграждане на изпитваното вещество (вж. втора алинея от раздел 1.8.8.3).

1.8.7. Добавяне на изпитваното (или на референтното) вещество

За вещества с висока водоразтворимост ($> 1 \text{ mg/L}$) и ниска летливост (с константи по закона на Хенри $< 1 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ или $< 10^{-5} \text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$) може да бъде приготвен изходен разтвор в дейонизирана вода (вж. раздел 1.8.2); подходящото количество от изходния разтвор се добавя в стъклените съдове за изпитване с цел постигане на желаната концентрация. Обемът на даден добавен изходен разтвор трябва да бъде сведен до функционалния минимум ($< 10\%$ от крайния обем на течността, ако е възможно). Друга възможна процедура е разтварянето на изпитваното вещество в по-голям обем от водата за изпитване, което може да се счете за алтернатива на използването на органични разтворители.

▼ M1

Ако е неизбежно, изходните разтвори на нелетливите вещества със слаба водоразтворимост трябва да се приготвят чрез използването на летлив органичен разтворител, но количеството разтворител, добавено към системата за изпитване, не трябва да превишава 1 % v/v и не трябва да оказва неблагоприятен ефект върху микробиалната активност. Разтворителят не трябва да влияе върху стабилността на изпитваното вещество във вода. Разтворителят трябва да бъде в изключително малко количество, за да не увеличи чувствително концентрацията на DOC във водата за изпитване или в суспензията. Това трябва да се провери чрез специфичен за съответното вещество анализ, или, по възможност, чрез анализ на DOC (5). Трябва да се обезпечи ограничаването на количеството на прехвърления разтворител до абсолютно необходимото, както и да се осигури разтварянето на количеството изпитвано вещество в крайния обем вода за изпитване. Други техники за въвеждане на изпитваното вещество в стъклените съдове за изпитване могат да бъдат използвани, както е указано в (6) и (7). Когато даден органичен разтворител се използва за прилагане на изпитваното вещество, контролните проби на разтворителя, съдържащи вода за изпитване (без никакви добавки) и водата за изпитване с добавено към нея референтно вещество трябва да бъдат обработени по същия начин като използваните стъклени съдове за изпитване, допълнени с изпитвано вещество в среда от разтворител. Целта на контролните проби на разтворителите е изследването на евентуалните неблагоприятни ефекти върху микробиалната популация, причинени от разтворителя, за които свидетелства разграждането на референтното вещество.

1.8.8. Условия на изпитване**1.8.8.1. Температура на изпитване**

Инкубацията трябва да се извърши на тъмно (за предпочитане) или на слаба светлина при регулирана температура (± 2 °C), която може да бъде температура на средата или стандартна температура от 20—25 °C. Температура на средата може да бъде или реалната температура на пробата към момента на вземането ѝ, или средната околна температура на мястото на вземане на пробата.

1.8.8.2. Размесване

Трябва да се осигури размесване чрез непрекъснато разклащане или разбъркване с цел поддържане на частиците и на микроорганизмите в състояние на суспензия. Размесването улеснява също трансфера на кислорода от въздуха над течността, за да се осигури поддържането на подходящи аеробни условия. Поставете колбите върху вибрационен плот (с приблизително 100 rpm) или използвайте магнитно разбъркване. Размесването не трябва да се прекъсва. Въпреки това, разклащането или разбъркването трябва да се извършват възможно най-деликатно, като същевременно с това се поддържа хомогенна суспензия.

1.8.8.3. Продължителност на изпитването

Нормалната продължителност на изпитването не трябва да надвишава 60 дни, освен ако не се използва полунепрекъснатата процедура с периодично подновяване на изпитваната суспензия (вж. раздел 1.8.6 и допълнение 2). При все това периодът на изпитване за серийното изпитване може да бъде удължен до максимум 90 дни, ако разграждането на изпитваното вещество е започнало в рамките на първите 60 дни. Разграждането се наблюдава през съответните интервали от време, като се определя остатъчната активност ^{14}C или отделения $^{14}\text{CO}_2$ (вж. раздел 1.8.9.4) и/или чрез химичен анализ (раздел 1.8.9.5). Инкубационният период трябва да бъде достатъчно дълъг, за да позволи оценяването на процеса на разграждане. За предпочитане е степента на разграждане да надвишава 50 %; за бавно разграждащи се вещества степента на разграждане трябва да бъде достатъчна (обикновено над 20 % разграждане), за да позволи определянето на скоростната константа на процеса на разграждане.

▼ **M1**

Трябва да се провеждат периодични измервания на рН и концентрацията на кислород в системата за изпитване, освен ако предходният опит от подобни изпитвания в проби от вода и утайка, взети от същото място, не правят ненужно извършването на такива измервания. При определени условия метаболизъмът на първичните субстрати при много по-високи концентрации във водата или утайката могат да доведат евентуално до значителна промяна на експерименталните условия по време на изпитването под въздействието на достатъчно отделен CO_2 и достатъчно намаляване на кислорода.

1.8.9. **Процедура**1.8.9.1. *Подготовка на колби за нелагични изпитвания*

Прехвърлете подходящо количество вода за изпитване в колбите за изпитване, запълвайки до около една трета от обема на колбите, но не по-малко от около 100 ml. При използването на няколко колби (за да е възможно обработването на цяла колба във всяко време на вземане на проби), подходящият обем вода за изпитване отново е около 100 ml, тъй като малките обеми проби могат да повлияят върху продължителността на латентния период. Изпитваното вещество се добавя от изходен разтвор, както е описано в раздели 1.8.2 и 1.8.7. Най-малко две различни концентрации на изпитваното вещество, с разлика помежду си от 5 до 10 пъти, трябва да бъдат използвани с цел определянето на кинетиката на разграждане и изчисляването на скоростната константа на разграждане. И двете избрани концентрации трябва да са по-малки от 100 $\mu\text{g/L}$ и за предпочитане е да бъдат в диапазона $< 1\text{—}10 \mu\text{g/L}$.

Затворете колбите със запушалки или капаци, които не пропускат въздух и CO_2 . За немаркирани с ^{14}C нелетливи изпитвани вещества са подходящи тапи от памук, които предпазват от замърсявания от въздуха (вж. раздел 1.8.1), при условие че е известно, че основните продукти на разграждане са нелетливи, както и при индиректно определяне на CO_2 (вж. допълнение 3).

Инкубирайте колбите при избраната температура (вж. раздел 1.8.8.1). Вземете проби за химичен анализ или измервания на ^{14}C в началото на изпитването (т.е. преди да започне биоразграждането; вж. раздел 1.7.1), а след това през определени интервали от време в процеса на изпитването. Вземането на проби може да се извърши чрез отделяне на подпроби (напр. аликвотни части от 5 ml) от всяка реплика или чрез вземане на цели колби при всяко отделно вземане на проба. Минерализацията на изпитваното вещество може да бъде определена директно или индиректно (вж. допълнение 3). Обикновено по време на фазата на разграждане са необходими минимум пет пробни точки (т.е. след края на латентния период), за да се определи с достатъчна точност скоростната константа, освен ако не съществуват основания да се смята, че три пробни точки са достатъчни за бързо разграждащите се вещества. За бавно разграждащи се вещества могат лесно да бъдат направени повече измервания по време на фазата на разграждане и в този случай трябва да се използват повече измервателни точки за определянето на k . Не може да бъде установен фиксиран времеви график за вземане на проби, тъй като скоростта на биоразграждане варира; въпреки това, в случай че процесът на разграждане е бавен, се препоръчва ежеседмично вземане на проби. Ако изпитваното вещество е бързо разградимо, вземането на проби трябва да се извършва веднъж на ден по време на първите три дни, след което на всеки втори или трети ден. При определени обстоятелства, като например при много бързо хидролизиращи вещества, може да се наложи ежечасно вземане на проби. Препоръчва се да се извърши предварително проучване преди началото на изпитването, за да се определят подходящите интервали за вземане на проби. Ако е необходимо наличието на проби за последващ специфичен анализ, препоръчително е да се вземат повече проби, след което да се избера онези, които ще бъдат анализирани в края на експеримента, като се следва обратна последователност, т.е. последните проби се анализират първи (вж. втора алинея от раздел 1.8.9.5 за насоки относно стабилността на пробите по време на съхраняването).

▼ M11.8.9.2. *Брой колби и проби*

Трябва да разполагате с достатъчен брой колби за изпитване, за да осигурите:

- колби за изпитване; най-малко по две колби за всяка концентрация от изпитваното вещество (за предпочитане е най-малко 3) или няколко колби за изпитване за всяка концентрация, в случай че се вземат цели колби при всяко вземане на проби (обозначение F_T);
- колби за изпитване за изчисляване на тегловния баланс; най-малко по две колби за всяка концентрация от изпитваното вещество (обозначение F_M);
- празна проба, без изпитвано вещество; най-малко една празна колба за изпитване, съдържаща само вода за изпитване (обозначение F_B);
- референтен контрол; две колби с референтното вещество (напр. анилин или натриев бензоат, при 10 $\mu\text{g/l}$) (обозначение F_C). Целта на референтния контрол е да се потвърди минимална микробна активност. Ако е удобно, може да бъде използвано радиомаркирано референтно вещество, също и когато разграждането на изпитваното вещество се контролира чрез химични анализи;
- стерилен контрол; една или две колби, съдържащи стерилизирана вода за изпитване за изследване на възможното абиотично разграждане или друго небиологично отстраняване на изпитваното вещество (обозначение F_S). Биологичната активност може да бъде прекъсната с автоклавна обработка (121 °C; 20 мин.) на водата за изпитване или чрез добавяне на токсично вещество (напр. натриев азид (NaN_3) 10—20 g/l, живачен хлорид (HgCl_2) 100 mg/l или формалин 100 mg/l), както и чрез облъчване с гама лъчи. Ако се използва HgCl_2 , той трябва да бъде изхвърлен като токсичен отпадък. При вода, към която е добавено голямо количество утайка, не е лесно да се постигнат стерилни условия; в този случай се препоръчва повторна автоклавна обработка (напр. трикратна). Трябва да се вземе под внимание, че сорбционните характеристики на утайката могат да бъдат променени от автоклавната обработка;
- контрол на разтворителя, със съдържание на вода за изпитване и вода за изпитване с примес на референтно вещество; паралелен анализ в колби, обработвани с еднакво количество разтворител и при използването на същата процедура като при прилагането на изпитваното вещество. Целта е да се изследват възможните неблагоприятни ефекти на разтворителя, определяйки разграждането на референтното вещество.

При планирането на изпитването изследвателят трябва да вземе под внимание относителната важност на увеличената репликационност при експеримента спрямо увеличен брой интервали на вземане на проби. Точният брой на необходимите колби ще зависи от метода, използван за измерване на разграждането (вж. трета алинея от раздел 1.8.9.1; раздел 1.8.9.4 и допълнение 3).

▼ M1

Две подпроби (напр. аликвотни части от 5 ml) трябва да бъдат взети от всяка колба за изпитване за всеки интервал на вземане на проба. Ако се използват няколко колби с цел вземане на цели колби, за всеки интервал на вземане на проба трябва да се използват минимум две колби (вж. първа алинея от раздел 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Подготовка на колби за изпитване със суспендирана утайка [по избор]*

Добавете в изпитвателните съдове за изпитване необходимите количества вода и утайка за изпитване, ако е необходимо (вж. раздел 1.8.5). Подготовката на колбите за изпитване със суспендирана утайка е същата като при пелагичното изпитване (вж. раздели 1.8.9.1 и 1.8.9.2). За предпочитане е използването на серумни бутилки или на колби с подобна форма. Поставете затворените колби в хоризонтално положение върху вибрационен плот. Както се подразбира, отворените колби за немаркирани с ^{14}C нелетливи вещества трябва да бъдат поставени в изправено положение; в този случай е препоръчително магнитно разбъркване и използването на магнитни бъркалки със стъклено покритие. Ако е необходимо, аерирайте бутилките за поддържане на подходящи аеробни условия.

1.8.9.4. *Радиохимични измервания*

Отделеният $^{14}\text{CO}_2$ се измерва директно и индиректно (вж. допълнение 3). $^{14}\text{CO}_2$ се определя индиректно чрез разликата между първоначалната активност ^{14}C във вода за изпитване или в суспензия и общата остатъчна активност в съответното време на вземане на пробата, измерена след подкиселяването на пробата до рН 2—3 и отстраняването на CO_2 . По този начин неорганичният въглерод се отстранява и измерената остатъчната активност се обуславя от органичен материал. Индиректното определяне на $^{14}\text{CO}_2$ не трябва да се използва, ако в хода на трансформация на изпитваното вещество се формират основни летливи продукти на трансформация (вж. допълнение 3). По възможност, отделянето на $^{14}\text{CO}_2$ трябва да се измерва директно (вж. допълнение 3) при всеки интервал на вземане на проба в най-малко една колба за изпитване; тази процедура позволява проверката както на тегловния баланс, така и на процеса на биоразграждане, но е приложима единствено за изпитвания, провеждани със затворени колби.

Ако отделеният $^{14}\text{CO}_2$ се измерва директно по време на изпитването, трябва да си осигурите повече колби за тази цел в началото на изпитването. Директното измерване на $^{14}\text{CO}_2$ се препоръчва, ако по време на трансформацията на изпитваното вещество се формират основни летливи продукти на трансформация. При всяка точка на измерване допълнителните колби за изпитване се подкиселяват до рН 2—3 и $^{14}\text{CO}_2$ се събира във вършен или външен абсорбер (вж. допълнение 3).

По избор концентрациите на маркирани с ^{14}C изпитвани вещества и основните продукти на трансформация могат да се определят чрез използването на радиохроматография (напр. тънкослойна хроматография, RAD-TLC) или високоефективна течна хроматография HPLC с радиохимична детекция.

По избор може да се определи фазовото разпределение на остатъчната радиоактивност (вж. допълнение 1) и остатъчното изпитвано вещество и продуктите на трансформация.

▼ M1

В края на изпитването трябва да се определи тегловният баланс чрез директно измерване на $^{14}\text{CO}_2$, използвайки отделни колби за изпитване, от които не са вземани никакви проби по време на изпитването (вж. допълнение 3).

1.8.9.5. Специфичен химичен анализ

При наличие на чувствителен специфичен аналитичен метод първоначалното биоразграждане може да бъде оценено чрез измерване на общата остатъчна концентрация на изпитваното вещество, вместо използването на техники за радиомаркиране. Ако се използва радиомаркирано вещество (за измерване на общата минерализация), могат да бъдат провеждани паралелно специфични химични анализи с цел осигуряване на полезна допълнителна информация и проверка на процедурата. Специфични химични анализи могат да се провеждат и за измерване на продуктите на трансформация, получени по време на разграждането на изпитваното вещество, като това се препоръчва по отношение на вещества, които се минерализират с периоди на полуразпад над 60 дни. Концентрацията на изпитваното вещество и продуктите на трансформация при всеки интервал на вземане на проби трябва да бъдат измервани и отчитани (като концентрация и като процент от използваното количество). Обикновено ще бъдат идентифицирани продукти на трансформация $\geq 10\%$ от използваната концентрация за всеки интервал на вземане на проба, освен ако няма сериозни основания за противното. Продуктите на трансформация, за които концентрациите постоянно се увеличават по време на изследването, също трябва да бъдат взети под внимание при идентифицирането, дори и техните концентрации да не превишават горните граници, тъй като това би могло да очертава някаква тенденция. Ако се допуска възможността за бърза абиотична трансформация на изпитваното вещество (напр. хидролиза), трябва да се предвидят анализи на продуктите на трансформация при контрол на стерилността. Нуждата от количествено определяне и идентифициране на продуктите на трансформация трябва да се преценява за всеки отделен случай, като съответните обосновки се посочват в протокола. Техниките за екстракция с органичен разтворител трябва да се прилагат в съответствие с инструкциите, описани в съответната аналитична процедура.

В случай че анализът се извършва в рамките на 24 часа (за предпочитане), всички проби трябва да се съхраняват при температура от 2 до 4 °C и в условия на херметизация. При по-продължителен период на съхранение пробите трябва да са замразени до температура под -18 °C или третирани с химични консерванти. Подкиселяването не е препоръчителен метод за съхраняване на пробите, тъй като подкиселените проби могат да са нестабилни. Ако пробите не се анализират в рамките на 24 часа и подлежат на по-продължителен период на съхраняване, трябва да се проведе изследване на устойчивостта в условията на съхранение, за да се установи стабилността на въпросните химични вещества при съхранение при температура под -18 °C или при обработка с химични консерванти. Ако аналитичният метод изисква или екстракция с разтворител, или екстракция в твърда фаза, екстракцията трябва да се извърши веднага след вземането на пробата или след запазването на замразената проба за максимален период от 24 часа.

В зависимост от чувствителността на аналитичния метод може да се наложи използването на по-големи обеми проби от посочените в раздел 1.8.1. Изпитването може да бъде извършено лесно с изпитвани обеми от един литър в колби с вместимост от 2—3 литра, което би позволило вземането на проби от около 100 ml.

▼ **M1**

2. ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

2.1.1. Графично изобразяване на данните

Интервалите на вземане на пробите трябва да се закръглят на цели часове (освен ако веществото не се разгражда значително за минути до часове), но не и на цели дни. Изобразявайте данните за остатъчната активност на изпитваното вещество (за маркирани с ^{14}C вещества) или за остатъчната концентрация (за немаркирани вещества), спрямо времето както в линейна, така и в полулогаритмична графика (вж. фигури 1а, 1б). Ако се е извършило разграждане, сравнете резултатите от колби F_T с тези от колби F_S . Ако резултатите от колбите с изпитваното вещество (F_T) и стерилните колби (F_S) се различават с по-малко от 10 %, може да се предположи, че наблюдаваното разграждане е предимно абиотично. Ако разграждането в колби F_S е по-ниско, данните могат да бъдат използвани за коригиране на получените от колби F_T (чрез изваждане) с цел установяване на степента на биоразграждане. Когато по избор се провеждат анализи на основни продукти на трансформация, трябва да бъдат представени графики на тяхното формиране и спад в допълнение към графичното изобразяване на намаляването на изпитваното вещество.

Установете продължителността на латентния период t_L от кривата на разграждането (полулогаритмична графика) чрез екстраполация на нейната линейна част до нулево разграждане или алтернативно чрез определяне на времето за разграждане в размер на около 10 % (вж. фигури 1а и 1б). От полулогаритмичната графика установете скоростната константа от първи порядък k и нейната стандартна грешка чрез линейна регресия на \ln (остатъчна активност ^{14}C или концентрация на изпитваното вещество) спрямо времето. Специално при измерванията ^{14}C използвайте единствено данни, принадлежащи към началната линейна част на кривата след приключилата латентна фаза и отдайте предпочитание на избора на известно количество представителни данни, вместо на голям обем несигурни данни. Несигурността в случая се определя от грешки, обусловени от препоръчаното директно използване на измерени остатъчни ^{14}C активности (вж. по-долу). В някои случаи би било уместно изчисляването на две различни скоростни константи, ако разграждането се развива по двуфазен модел. За тази цел се определят две различни фази на кривата на разграждане. Изчисленията на скоростната константа k и на периода на полуразпад $t_{1/2} = \ln 2/k$ трябва да се извършват за всяка отделна репликатна колба, когато се вземат подпроби от една и съща колба, или чрез използване на средните стойности, когато в рамките на един интервал на вземане на проби се вземат цели колби (вж. последната алинея от раздел 1.8.9.2). Когато се използва първата от посочените процедури, скоростната константа и периодът на полуразпад трябва да се отчитат за всяка отделна репликатна колба като средна стойност със стандартна грешка. В случай че са били използвани високи концентрации на изпитваното вещество, кривата на разграждане може значително да се отклонява от права линия (полулогаритмична графика) и кинетиката от първи порядък може да не е валидна в този случай. В този смисъл определянето на периода на полуразпад е безпредметно. Въпреки това, за ограничен обем данни може да се приложи кинетика от първи порядък и да се установи периодът на полуразграждане DT_{50} (време за достигане на разграждане в размер на 50 %). Следва обаче да се има предвид, че продължителността на разграждане извън избрания обем данни не може да бъде прогнозирана на базата на показателя DT_{50} , който единствено описва избраните данни. Предлага се широк набор от аналитични инструменти, улесняващи статистическите изчисления и апроксимацията на кривите, а използването на такъв софтуер е препоръчително.

▼ **M1**

В случай на извършване на специфични химични анализи, установените скоростните константи и периодите за първоначалното полуразграждане, както по-горе за общата минерализация. Ако първоначалното разграждане е пределният процес, понякога могат да се използват базови точки от целия ход на разграждането. Това се дължи на факта, че измерванията са директни, за разлика от измерванията на активността ^{14}C .

Ако се използват маркирани с ^{14}C вещества, тегловният баланс трябва да се изрази като процент от използваната първоначална концентрация, най-малкото в края на изпитването.

2.1.2. **Остатъчна активност**

Когато маркираната с ^{14}C част от дадено органично вещество бъде биоразградена, основната част от ^{14}C преминава в $^{14}\text{CO}_2$, докато друга се използва за нарастване на биомасата и/или за синтез на извънклетъчни метаболити. По тази причина пълното „максимално“ биоразграждане на дадено вещество не води до 100-процентово преминаване на въглерода в неговия състав в $^{14}\text{CO}_2$. Вграденият в продукти от биосинтеза ^{14}C впоследствие бавно се отделя под формата на $^{14}\text{CO}_2$ в резултат на „вторична минерализация“. По тези причини графичните изображения на остатъчната активност на органичен ^{14}C (измерена след отстраняването на CO_2) или на произведения $^{14}\text{CO}_2$ спрямо времето ще покаже „сnižаване“ след приключване на процеса на биоразграждане. Това усложнява кинетичното интерпретиране на данните и за целта само началната част на кривата (след края на латентния период и преди достигането на около 50 % от процеса на разграждане) трябва обикновено да бъде използвана за установяването на скоростната константа на разграждане. Ако изпитваното вещество бъде разградено, общата остатъчна активност на органичния ^{14}C винаги е висока от активността ^{14}C , свързана с остатъчното непроменено изпитвано вещество. Ако изпитваното вещество се разгражда чрез реакция от първи порядък и една постоянна фракция α се минерализира в CO_2 , началният наклон на кривата на концентрация на ^{14}C (общ органичен ^{14}C спрямо времето) ще бъде α пъти наклона на съответната крива на концентрацията на изпитваното вещество (или по-точно, частта от изпитваното вещество, маркирана с ^{14}C). Използвайки некоригирани измервания на общата активност на органичен ^{14}C , изчислената скоростна константа на разграждане ще бъде стабилна. Процедурите за установяване на концентрациите на изпитваното вещество от измерените радиохимични активности на базата на различни опростяващи допускания са описани в литературата (1)(8)(9)(10). Подобни процедури са най-лесно приложими за бързо разграждащи се вещества.

2.2. **ИНТЕРПРЕТИРАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Ако бъде установено, че k зависи от добавената концентрация (т.е. ако изчислената k е приблизително една и съща при различни концентрации на изпитваното вещество), може да се предположи, че скоростната константа от първи порядък е представителна за използваните условия на изпитване, т.е. изпитваното вещество, водната проба и температурата на изпитване. Чрез експертна оценка трябва да се определи до каква степен резултатите могат да бъдат обобщени или екстраполирани към други системи. Ако се използва висока концентрация на изпитваното вещество, поради което процесът на разграждане не се развива по кинетичен модел от първи порядък, данните не могат да бъдат използвани за директно определяне на скоростната константа от първи порядък или на съответния период на полуразграждане. Въпреки това, данните, получени от изпитването при използването на висока концентрация на изпитваното вещество, могат все още да послужат за пресмятането на степента на общата минерализация и/или откриваемост и количествено определяне на продуктите на трансформацията.

▼ M1

Ако са известни скоростите на други процеси на преобразуване, различни от биоразграждането (напр. хидролиза или изпарение), те могат да бъдат приспаднати от нетната скорост на превръщане, констатирана по време на изпитването, за да се определи една приблизителна скорост на биоразграждане. Данни за хидролизата могат да бъдат получени например от стерилните контроли или от паралелното изпитване при използване на по-висока концентрация на изпитваното вещество.

Директното и индиректното определяне на $^{14}\text{CO}_2$ (раздел 1.8.9.4 и допълнение 3) могат да бъдат използвани единствено за измерване на степента на минерализация на изпитваното вещество до CO_2 . За анализирането на концентрациите на маркирани с ^{14}C изпитвани вещества и на формирането на основни продукти на трансформацията (вж. трета алинея от раздел 1.8.9.4) могат да бъдат използвани радиохроматография (RAD-TLC) или HPLC. Директното определяне на периода на полуразграждане е възможно единствено при липсата на всякакви основни продукти на трансформация (определени като $\geq 10\%$ от използваното количество изпитвано вещество). В случай че се наблюдава наличие на основни продукти на трансформация, отговарящи на горната дефиниция, трябва да се извърши подробна оценка на данните. Тя може да включва повторно изпитване и/или идентификация на продуктите на трансформация (вж. първа алинея от раздел 1.8.9.5), освен ако пътят на продуктите на трансформация не може да бъде достоверно описан на базата на предходния опит (напр. информация за пътя на разграждане). Тъй като съотношението на въглерода в изпитваното вещество, преобразуван в CO_2 , варира (до голяма степен в зависимост от концентрацията на изпитваното вещество и на други налични субстрати, от условията на изпитване и от микробналната среда), това изпитване не позволява директно определяне на пълното биоразграждане, както при изпитването за отмиране на DOC; но резултатът е сходен с този, получен при респирометрично изпитване. По тази причина степента на минерализация ще бъде по-малка или равна на минималната степен на пълното биоразграждане. За да се получи по-пълна представа за пълното биоразграждане (минерализация и включване в биомаса), в края на изпитването следва да се извърши анализ на фазовото разпределение на ^{14}C (вж. допълнение 1). Намиращият се в групата на частиците ^{14}C ще се състои от ^{14}C , включен в бактериална биомаса, и ^{14}C , сорбиран от органични частици.

2.3. ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

Ако референтното вещество не се е разградило в рамките на очаквания интервал от време (по отношение на анилина и натриевия бензоат този период обикновено е под две седмици), валидността на изпитването се подлага под съмнение и трябва да бъде проверена допълнително или изпитването трябва да се повтори с нова водна проба. При кръгово изпитване по ISO на метода, в което участваха седем лаборатории от различни точки на Европа, отчетените скоростни константи на разграждане по отношение на анилина варират от 0,3 до 1,7 ден^{-1} (средно 0,8 d^{-1}) при температура 20 °C и стандартна грешка $\pm 0,4 \text{ d}^{-1}$ ($t_{1/2} = 0,9$ дни). Установените латентни периоди варират от 1 до 7 дни. В изследваните води е установено наличие на бактериална биомаса, съответстваща на 103—104 колонообразуващи единици (CFU)/ml. Скоростите на разграждане в богатите на хранителни вещества средноевропейски води са по-високи в северните олиготрофни води, което би могло да се дължи на различния трофичен статус или на предходен контакт с химични вещества.

Общото възстановяване (тегловен баланс) в края на експеримента трябва да е между 90 % и 110 % за радиомаркираните вещества, докато първоначалното възстановяване в началото на експеримента трябва да е между 70 % и 110 % за немаркираните вещества. При все това, посочените диапазони трябва да бъдат възприемани като цели и не трябва да се използват като критерии за приемане на изпитването.

▼ M1

3.

ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Видът на изследването (пелагично изпитване или изпитване със суспендирани утайки) трябва да бъде ясно посочен в протокола от изпитването, който трябва също така да съдържа следната задължителна информация:

Изпитвано вещество и референтно вещество/вещества:

- тривиални наименования, химични наименования (препоръчително е използването на наименованията по IUPAC и/или CAS), CAS номера, структурни формули (показващи разположението на ^{14}C в случай на използване на радиомаркирани вещества) и съответните физикохимични свойства на изпитваното вещество и на референтното вещество (вж. раздели 1.5 и 1.6);
- химични наименования, CAS номера, структурни формули (показващи разположението на ^{14}C в случай на използване на радиомаркирани вещества) и съответните физикохимични свойства на вещества, използвани като стандарти за идентифициране и количествено определяне на продуктите на трансформация;
- чистота (примеси) на изпитваните вещества и на референтни вещества;
- радиохимична чистота на маркираните реактиви и специфична активност (където е уместно).

Повърхностни води:

Трябва да бъде предоставена следната задължителна информация за взетата водна проба:

- местоположение и описание на мястото на вземане на пробата, включително (ако е възможно) история на замърсяване;
- дата и час на вземане на пробата;
- хранителни вещества (общ N, амониеви радикали, нитрити, нитрати, общ P, разтворен ортофосфат);
- дълбочина на вземане на пробата;
- външен вид на пробата (напр. цвят и мътност);
- DOC и TOC;
- BOD;
- температура и рН на мястото и към момента на вземане на пробата;
- окислително-редукционен потенциал (задължително само ако аеробните условия не са очевидни);
- соленост или проводимост (в случай на морска вода и солена вода);
- суспендирани неразтворени вещества (при мътност на пробата);
- всякаква друга подходяща информация за мястото на вземане на пробата към момента на вземането ѝ (напр. актуална или предходна информация за водните количества на реките или на морските течения, основни зауствания в близките околности и видове зауствания, климатични условия преди момента на вземане на пробата);

и по избор:

- микробиална биомаса (напр. директно отчитане на акридин оранж или колонообразуващи единици);

▼ M1

- неорганичен въглерод;
- концентрация на хлорофил-а като специфичен показател за биомаса от водорасли.

В допълнение към това в случай на извършване на изпитване със суспендирани утайки трябва да бъде представена следната информация за утайките:

- дълбочина на вземане на проби от утайки;
- външен вид на утайките (оцветени, мътни, тинести или пясъчливи);
- текстура (напр. процент едър пясък, фин пясък, тиня и глина)
- сухо тегло на суспендираните неразтворени вещества в g/l, концентрация на ТОС или загуба на тегло при горене като показател за измерване на съдържанието на органично вещество;
- рН
- окислително-редукционен потенциал (задължително само ако аеробните условия не са очевидни).

Условия на изпитване:

- период между вземането на пробата и използването ѝ за лабораторното изпитване, съхранение и предварителна обработка на пробата, дати на извършване на изследванията;
- количество на използваното изпитвано вещество, изпитвана концентрация и референтно вещество;
- метод за прилагане на изпитваното вещество, включително и употребата на всякакви разтворители;
- обем на използваната повърхностна вода и на утайките (в случай на употребата на такива) и обем на взетата за анализ проба за всеки отделен интервал;
- описание на използваната система на изпитване.

Ако изпитването не се провежда на тъмно, трябва да се предостави информация за условията на „слабо осветление“:

- информация за метода/методите, използвани за установяване на стерилен контрол (напр. температура, време и брой автоклавни обработки);
- температура на инкубиране;
- информация за аналитичните техники и методи, използвани за радиохимични измервания и за проверка на тегловния баланс и за измервания на фазовото разпределение (ако се провеждат такива).
- брой на репликатите.

Резултати:

- проценти на възстановяване (вж. раздел 1.7.1);
- повтаряемост и чувствителност на използваните аналитични методи, включително границата на откриваемост (LOD) и границата на количествено определяне (LOQ) (вж. раздел 1.7.2);

▼ **M1**

- всички измерени данни (включително моментите на вземане на пробите) и изчислени величини в таблична форма и криви на разграждане; за всяка изпитвана концентрация и за всяка репликатна колба трябва да се отчете коефициентът на линейна корелация за наклона на логаритмичната графика, установеният латентен период и скоростната константа от първи или псевдо първи порядък (по възможност), както и съответният период на полуразграждане (или периодът на полуразпад t_{50});
- отчитане на съответните величини като средни стойности на наблюдаваните резултати при отделните репликати, напр. дължина на латентния период, скоростна константа на разграждане и период на полуразпад (или t_{50});
- категоризиране на системата или като приспособена, или като неприспособена, съдейки по вида на кривата на разграждане и по евентуалното влияние на изпитваната концентрация;
- резултати от окончателната проверка на тегловния баланс и резултати от измерванията на фазовото разпределение (при наличие на такива);
- дял на минерализиран ^{14}C и при използване на специфични анализи, пълна степен на първоначално разграждане;
- идентифициране, моларна концентрация и процент на използваните продукти и основните продукти на трансформация (вж. първа алинея от раздел 1.8.9.5), където е уместно;
- предложен път на трансформация, където е уместно;
- обсъждане на резултатите.

4.

ЛИТЕРАТУРА

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test
2. ISO/DIS 14592—1 (1999) Качество на водите — оценка на аеробната биоразградимост на органични съединения при ниски концентрации — част 1: Серийно изпитване в колби за разклащане с повърхностна вода или суспензии повърхностна вода/утайка.
3. Метод за изпитване C.23. Аеробна и анаеробна трансформация в почва.
4. Метод за изпитване C.24. Аеробна и анаеробна трансформация във водни утайки.
5. ОИСП (1993). Насоки за изпитването на химикали. ОИСП, Париж.
6. ISO 8245 (1999). Качество на водите — насоки за определянето на общия ограничен въглерод (TOC) и на разтворения органичен въглерод (DOC).
7. ISO 10634 (1995). Качество на водите — насоки за подготовката и обработването на лошо водоразтворими органични вещества за последваща оценка на биоразградимостта им във водна среда.
8. ОИСП проект (2000). Документ с насоки за изпитване за токсичност във водна среда на трудни вещества и смеси. Публикации за здравословността и безопасността на околната среда. Поредица относно изпитването и оценката. № 22 (за публикуване през лятото на 2000 г.).

▼ M1

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 394—401.
10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ¹⁴C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 274—283.
11. ISO/CD 14592—1 (1999). Доклад от кръгово изпитване: Качество на водите — оценка на аеробната биоразградимост на органични съединения при ниски концентрации част 1 — доклад от кръговото изпитване от 1998/1999 г. Серийно изпитване в колби за разклащане с повърхностна вода или суспензии вода/утайка.

▼ M1

Допълнение 1

Фазово разпределение на ^{14}C

С цел да се провери процедурата, рутинните измервания на остатъчната обща активност на органичен ^{14}C (ТОА) трябва да бъдат допълнени с измервания на тегловния баланс, включващи директно определяне на отделения $^{14}\text{CO}_2$ след улавянето му в абсорбер (вж. допълнение 3). Само по себе си, действителното получаване на $^{14}\text{CO}_2$ представлява недвусмислено доказателство за биоразграждане в противовес на абиотичното разграждане или други механизми на преобразуване, като изпарение и сорбция. Допълнителна полезна информация, характеризираща модела на биоразграждане, може да бъде получена от измерванията на разпределението на ТОА между разтвореното състояние (активност на разтворения органичен ^{14}C , DOA) и твърдото състояние (активност на органичния ^{14}C под формата на твърди частици, POA) след отделяне на твърдото вещество чрез мембранен филтър или центрофуга. POA се състои от изпитваното вещество, абсорбирано или адсорбирано от микробна биомаса и от други частици, в допълнение към въглерода от веществото на изпитването, използван за синтез на нов клетъчен материал и по този начин включен във фракцията на биомасата от частици. Образоването на разтворен органичен материал ^{14}C може да се определи като DOA в края на процеса на биоразграждане („платото“ на кривата на разграждане спрямо времето).

Установете фазовото разпределение на остатъчния ^{14}C в избрани проби, като филтрирате пробите през мембранни филтри с диаметри на отворите от 0,22 μm до 0,45 μm и изработени от материал, който не адсорбира значителни количества от изпитваното вещество (за целта биха могли да се използват поликарбонатни филтри). Ако сорбцията на изпитваното вещество от филтъра е прекалено голяма, за да не бъде взета под внимание (това трябва да се провери преди началото на експеримента), може да се използва високоскоростна центрофуга (2 000 g; 10 мин.), вместо филтриране.

Продължете филтрирането или центрофугирането на нефилтрираните проби, както е описано в допълнение 3. Разтворете мембранните филтри в подходящ сцинтилационен флуид и отчетете резултатите по нормалната процедура, обикновено като се използва само метода на определяне на съотношение с външен еталон за коригиране на потискането, или се използва оксидатор на проби. В случай че е използвана центрофуга, суспендирайте отново пелетата, формирана от фракцията на частиците, в 1–2 ml дестилирана вода и прехвърлете в сцинтилационна стъкленица. След това промийте двукратно с 1 ml дестилирана вода и прехвърлете водата от промиването в стъкленицата. При необходимост суспензията може да бъде внесена в гел с цел извършване на точно сцинтилационно броене.



M1

Допълнение 2

Полунепрекъснатата процедура

Може да се изисква удължено инкубиране до няколко месеца с цел постигане на достатъчно разграждане на устойчивите вещества. Обикновено продължителността на изпитването не надвишава 60 дни, освен ако характеристиките на оригиналната водна проба не се поддържат чрез подновяване на изпитваната суспензия. Въпреки това, периодът на изпитване може да бъде удължен до максимум 90 дни, без да се подновява изпитваната суспензия, ако разграждането на изпитваното вещество е започнало в рамките на първите 60 дни.

В хода на продължително инкубиране разнородността на микробиалната среда може да намалее поради различни механизми на преобразуване, както и поради евентуално изчерпване на основни хранителни вещества и първични въглеродни субстрати във водната проба. По тази причина се препоръчва използването на полунепрекъснато изпитване с цел достоверното определяне на скоростта на разграждане при слабо разграждащи се вещества. Тестът трябва да бъде стартиран с използването на полунепрекъснатата процедура, ако, на базата на предходен опит, се очаква, че за постигането на 20 % разграждане на веществото е необходим инкубационен период от три месеца. Алтернативно, нормалното серийно изпитване може да бъде променено на полунепрекъснато, ако за срок от приблизително 60 дни на изпитване по серийен метод не е постигнато никакво разграждане на изпитваното вещество. Когато бъде отчетена значителна степен на разграждане (напр. > 20 %), полунепрекъснатата процедура може да бъде преустановена и изпитването да продължи като серийен експеримент.

При полунепрекъснато изпитване на всеки две седмици около една трета от обема на изпитваната суспензия се заменя с прясно взета вода, като изпитваното вещество се добавя към първоначалната концентрация. Аналогично, в случай на извършване на незадължителното изпитване със суспендирани утайки към подновяващата вода към първоначалната концентрация се добавя утайка (между 0,01 и 1 g/l). При извършване на изпитването със суспендирани неразтворени вещества от утайки е важно да се поддържа напълно суспендирана система и по време на подновяването на водата, както и периодът на престой да бъде идентичен за неразтворените вещества и за водата, тъй като в противен случай желаното наподобяване на хомогенна водна система без отделни фази може да бъде нарушено. Поради тези причини при използване на полунепрекъснатата процедура се предпочита първоначалната концентрация на суспендирани утайки да бъде в по-ниската част на определения диапазон.

Препоръчаното добавяне на изпитвано вещество означава, че първоначалната концентрация на изпитваното вещество не е превишена от частичното подновяване на изпитваната суспензия, следователно приспособяването, което често се наблюдава при високи концентрации на изпитвано вещество, се предотвратява. Поради факта, че процедурата обхваща както повторна инокулация, така и компенсация на изчерпаните хранителни вещества и първични субстрати, първоначалното микробиално разнообразие се възстановява и продължителността на извършване на изпитването може да бъде удължена практически до безкрайност. Когато се използва полунепрекъснатата процедура, е важно да се отбележи, че остатъчната концентрация на изпитваното вещество трябва да бъде коригирана по отношение на количествата изпитвано вещество, които се добавят и отстраняват при всяко едно подновяване. Концентрацията на общото изпитвано вещество и тази на разтвореното вещество могат да бъдат използвани взаимозаменяемо по отношение на съединения, които имат незначителна абсорбционна способност. Абсорбцията е незначителна (< 5 %) при определени условия (0,1—1 g неразтворени вещества/l) за вещества с $\log K_{ow} < 3$ (приложимо за неутрални, липофилни съединения). Това се илюстрира от следното примерно изчисление: 0,1 g/l неразтворени вещества съответства приблизително на 10 mg въглерод на литър (въглеродна фракция, $f_C = 0,01$). Като се приеме, че;

$\log K_{ow}$ (от изпитваното вещество) = 3

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

Коефициент на разпределение, $K_d = f_C \times K_{oc}$,

след което разтворената част от общата концентрация (C-вода (C_w)/C-общо (C_t)) е:

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



M1

Допълнение 3

Определяне на $^{14}\text{CO}_2$

Индиректно определяне на $^{14}\text{CO}_2$

При рутинните измервания индиректният метод обикновено е най-бърз и най-прецизен, в случай че изпитваното вещество е нелетливо и не се преобразува в летлив продукт на трансформация. Просто прехвърлете нефилтрираните проби (напр. количество от 5 ml) в сцинтилационните стъкленици. Първоначалната нормална активност в пробите е 5 000—10 000 dpm (80—170 Bq), а минималната първоначална активност е около 1 000 dpm. CO_2 следва да бъде отстранен след подкиселяване до pH 2—3 с 1—2 капки концентрирана H_3PO_4 или HCl. Отстраняването на CO_2 следва да се извърши чрез пропускане на въздух за около половин—един час. Друга възможност е стъклените съдове да бъдат разклатени силно за около 1—2 часа (например върху вибрационен плот за микроплата) или да бъдат подложени на по-леко разклащане в продължение на една нощ. Ефикасността на способа за отстраняване на CO_2 трябва да бъде проверена (чрез удължаване на периода на аерация или на разклащане). След това трябва да бъде добавена сцинтилационна течност, подходяща за отчитане на водни проби, като пробата бъде хомогенизирана чрез вихров миксер, а радиоактивността, да бъде определена посредством точно сцинтилационно броене, като се извади фоновата активност, установена в празните проби за изпитване (F_b). Освен ако водата за изпитване не е силно оцветена или не съдържа висока концентрация на частици, пробите обикновено ще покажат еднородно потискане и ще бъдат достатъчни за извършването на корекции на потискането при използването на външен еталон. Ако водата за изпитване е силно оцветена, може да се наложи корекция на потискането чрез добавяне на вътрешен еталон. Ако концентрацията на частиците е висока, може да е невъзможно получаването на хомогенен разтвор или гел, или пък разликите в потискането между пробите може да са големи. В този случай може да бъде използван описаният по-долу метод по отношение на изпитвани суспензии. Ако изпитването се провежда като изпитване със суспендирани утайки, измерването на $^{14}\text{CO}_2$ може да се извърши индиректно чрез вземането на хомогенна проба от водата за изпитване/суспензия в размер на 10 ml и разделянето на фазите чрез центрофугиране при подходяща скорост (напр. 40 000 m/s^2 в продължение 15 мин.). След това водната фаза трябва да бъде обработена както е описано по-горе. Активността на ^{14}C под формата на твърди частици (РОА) трябва да се определи чрез повторно суспендиране на утайката в малко количество дестилирана вода, прехвърляне в сцинтилационни стъкленици и добавяне на сцинтилационна течност с цел образуване на гел (за целта се предлагат специални сцинтилационни течности). В зависимост от характера на частиците (напр. тяхното съдържание на органични вещества), може да се приложи изгиване на пробата в продължение на една нощ с помощта на тъканен солубилизатор и след това се извърши хомогенизиране чрез вихров миксер преди добавянето на сцинтилационна течност. Алтернативно, РОА може да се определи чрез горене при излишък на кислород чрез използването на оксидатор на проби. При отчитането трябва винаги да се вземат под внимание вътрешните стандарти и е възможно да се наложи извършването на корекции на потискането, като в допълнение се използва вътрешен стандарт за всяка отделна проба.

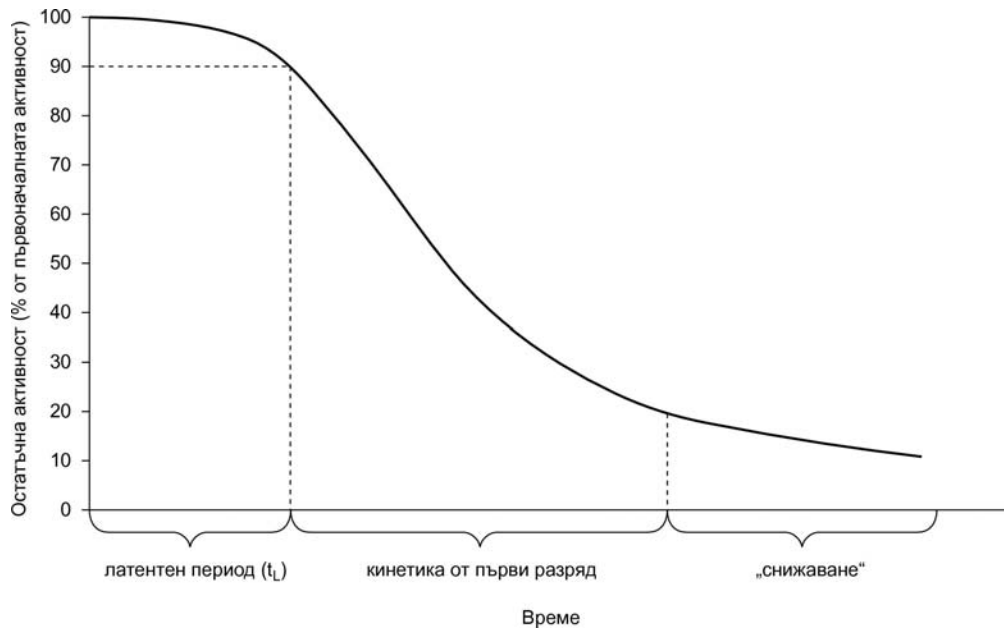
Директно определяне на $^{14}\text{CO}_2$

Ако отделеният $^{14}\text{CO}_2$ се измерва директно, това трябва да бъде извършвано чрез осигуряване на повече колби в началото на изпитването, зареждане на колбите за изпитване във всяка точка на измерване, чрез подкиселяване до pH 2—3 и събиране на $^{14}\text{CO}_2$ във вътрешен (поставен във всяка колба в началото на изпитването) или външен абсорбер. Като абсорбционно средство може да бъде използвана или основа (напр. 1 N разтвор на NaOH, или кубче NaOH), етаноламин или базирано на етаноламин вещество, както и предлагани в търговската мрежа абсорбанти. При директното измерване на $^{14}\text{CO}_2$ колбите трябва да бъдат затворени, например с прегради от бутилов каучук.

▼ M1

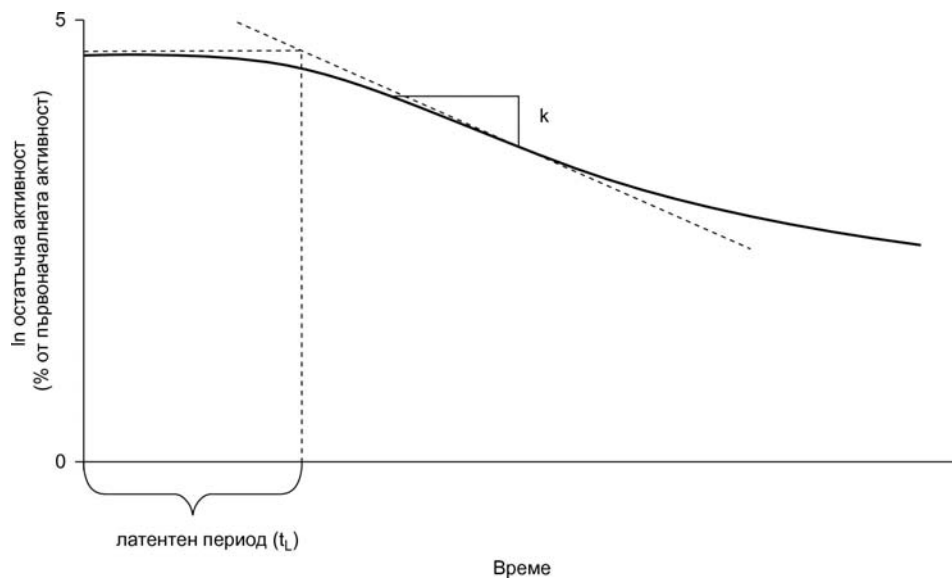
Фигура 1а

Пример за аритметично графично изобразяване (остатъчна активност спрямо времето)



Фигура 1б

Пример за полулогаритмично графично изобразяване (\ln остатъчна активност спрямо времето)



▼ M6

B.26. ИЗПИТВАНЕ НА ПОТИСКАНЕТО НА РАСТЕЖА НА ВИДОВЕ ОТ РОД *LEMNA*

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 221 (2006). Той е предназначен за оценяване на токсичността на химикали по отношение на сладководни растения от род *Lemna* (водна леща). Той се базира на съществуващи методи (1)(2)(3)(4)(5)(6), но включва и модификации на тези методи с цел да бъдат отразени най-съвременните научни изследвания и консултации по редица ключови въпроси. Настоящият метод за изпитване е валидиран чрез международно кръгово изпитване (7).
2. Настоящият метод за изпитване описва изпитване за токсичност с използване на *Lemna gibba* и *Lemna minor*, като и двата вида са били пространно изследвани и са предмет на посочените по-горе стандарти. Таксономията на *Lemna* spp. е трудна, тъй като е усложнена от съществуването на широк кръг от фенотипове. Въпреки че за *Lemna* може да възникне генетична изменчивост като реакция на токсични вещества, към момента няма достатъчно данни относно този източник на изменчивост, за да бъде препоръчан специфичен клон, който да бъде използван с настоящия метод за изпитване. Следва да се отбележи, че изпитването не е проведено при пълно отсъствие на чужди организми, но по време на процедурата за изпитване се предприемат поэтапни стъпки за поддържане на минимално замърсяване с други организми.
3. Описани са подробности от изпитването с обновяване (полустатично или проточно) на изпитвания разтвор и без обновяване (статично) на изпитвания разтвор. В зависимост от целите на изпитването и регулаторните изисквания се препоръчва да се обмисли прилагането на полустатичния метод и на проточния метод, например за химикали, които бързо се губят от разтвора в резултат на изпаряване, фоторазграждане, утаяване или биоразграждане. Допълнителни насоки са дадени в (8).
4. Определенията, които са използвани, са дадени в допълнение 1.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

5. Дадена е възможност експоненциално растящите растителни култури от род *Lemna* да растат като монокултури при различни концентрации на изпитвания химикал за период от седем дни. Целта на изпитването е да се определят количествено свързаните с химикала въздействия върху вегетативния растеж през този период, на базата на оценки на избрани измервани променливи. Броят на листовидните тела е главната измервана променлива. Най-малко още една измервана променлива (обща площ на листовидните тела, сухо тегло или свежо тегло) също се измерва, тъй като някои химикали могат да окажат много по-голямо въздействие върху други измервани променливи, отколкото върху броя на листовидните тела. За количествено определяне на свързани с химикалите въздействия, растежът в изпитваните разтвори се сравнява с този на контролните проби и концентрацията, при която се осъществява потискане на растежа до определените x % (например 50 %) се определя и се изразява като EC_x (например EC_{50}).
6. Крайната точка на изпитването е потискането на растежа, изразено като логаритмично нарастване на измерваната променлива (средна специфична скорост на растеж) през периода на експозицията. От средните специфични скорости на растеж, регистрирани в серия от изпитвани разтвори, се определя концентрацията, при която се осъществява потискане на скоростта на растежа до определените x % (например 50 %) и тя се изразява като E_rC_x (напр. E_rC_{50}).
7. Допълнителна зависима променлива, използвана в настоящия метод на изпитване, е добивът, който може да е необходим, за да бъдат изпълнени специфични регулаторни изисквания в някои държави. Той се определя като измерваните променливи в края на периода на експозиция минус измерваните променливи в началото на периода на експозиция. От добива, регистриран в серия от разтвори на изпитване се изчислява концентрацията, при която се осъществява потискане на добива до определените x % (например 50 %) и се изразява като E_yC_x (напр. E_yC_{50}).

▼ **M6**

8. В допълнение най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC) и концентрацията без наблюдавано въздействие (NOEC) могат да бъдат определени статистически.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНИЯ ХИМИКАЛ

9. Следва да е възможно използването на аналитичен метод с достатъчна чувствителност за количествено определяне на химикала в средата на изпитване.
10. Информацията относно изпитвания химикал, която може да бъде полезна при установяване на условията на изпитване, включва структурната формула, чистотата, водоразтворимостта, стабилността във вода и на светлина, pK_a , K_{ow} , парното налягане и биоразградимостта. Разтворимостта във вода и парното налягане може да се използват за изчисляване на константата по закона на Хенри, която ще покаже дали се очакват значителни загуби на изпитвания химикал през периода на изпитването. Това ще помогне да се разбере дали следва да се предприемат определени стъпки за контролиране на тези загуби. Когато информацията за разтворимостта и стабилността на изпитвания химикал е несигурна, се препоръчва те да бъдат оценени в условията на изпитване, т.е., среда на растеж, температура, режим на осветеност, които ще бъдат използвани при изпитването.
11. Когато контролът върху рН на средата на изпитването е особено важен, например при изпитване на метали или химикали, които са неустойчиви на хидролиза, се препоръчва добавянето на буфер към средата на растеж (вж. точка 21). Допълнителни насоки за изпитване на химикали, чиито физични и химични свойства затрудняват тяхното изпитване, са дадени в (8).

ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

12. За да е валидно изпитването, времето за удвояване на броя листовидни тела в контролната проба трябва да бъде по-малко от 2,5 дни (60 часа), съответстващо на седемкратно увеличение за седем дни и средна специфична скорост на растеж от $0,275 d^{-1}$. Използването на средата и на условията на изпитване, описани в настоящия метод за изпитване, позволяват постигането на този критерий с помощта на статичен режим на изпитване (5). Очаква се също, че този критерий е достижим и в условия на полустатично и проточно изпитване. Изчисляването на времето за удвояване е показано в точка 49.

РЕФЕРЕНТЕН ХИМИКАЛ

13. Референтният химикал (референтните химикали), като например 3,5-дихлорофенол, използван в международното кръгово изпитване (7), може да бъде изпитван като средство за проверка на процедурата за изпитване. Желателно е референтният химикал да се изпитва най-малко два пъти годишно или, когато изпитването се извършва по-рядко, да се извършва едновременно с определянето на токсичността на изпитвания химикал.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**Апаратура**

14. Цялото оборудване в контакт със средата на изпитване следва да е направено от стъкло или друг химически инертен материал. Стъклените съдове, използвани за отглеждане на култури и за изпитване, трябва да бъдат почистени от химични замърсители, които биха могли да проникнат в средата на изпитване, както и да бъдат стерилни. Съдовете за изпитването трябва да са достатъчно широки, така че листовидното тяло от различни колонии в контролните съдове да расте без припокриване в края на изпитването. Няма значение дали корените докосват дъното на съдовете за изпитване, но се препоръчва минимална дълбочина от 20 mm и минимален обем от 100 ml за всеки съд за изпитване. Изборът на съдовете за изпитването не е от решаващо значение, при условие че тези изисквания са изпълнени. Доказано е, че подходящи за целта са стъклени бехерови чаши, блюда кристализатори или стъкла на Петри с нужните размери. Съдовете за изпитването трябва да бъдат покрити с оглед минимизиране на изпарението и на

▼ **M6**

случайното замърсяване, като същевременно се даде възможност за циркулиране на въздуха. Подходящите съдове за провеждане на изпитването и особено капаците трябва да предотвратяват засенчването или промените в спектралните характеристики на светлината.

15. Културите и съдовете за изпитването не трябва да се съхраняват заедно. Това се постига най-добре с използването на осигуряващи необходимите за растежа параметри на околната среда отделни климатични камери, инкубатори или помещения. Необходимо е осветлението и температурата да могат да се контролират и да се поддържат на постоянно ниво (вж. точки 35—36).

Изпитван организъм

16. Организмът, използван за настоящото изпитване, е *Lemna gibba* или *Lemna minor*. Кратки описания на видовете водна леща, използвани за изпитване за токсичност, са дадени в допълнение 2. Растителният материал може да бъде получен от колекция от култури, от друга лаборатория или на място. Ако са събрани на място, растенията следва да се съхраняват в култура в същата среда, която се използва за изпитването, в течение на минимум осем седмици преди да се използват. Полевите обекти за събиране на място на началните култури трябва да са без явни източници на замърсяване. Ако са получени от друга лаборатория или от колекция от култури, те следва да се съхраняват по същия начин в течение на минимум три седмици. За източника на растителен материал, вида и клона (ако е известен), използвани в изпитването, трябва винаги да се протоколира.
17. Трябва да бъдат използвани монокултури, които нямат видимо замърсяване с други организми като водорасли и протозои. Здравите растения от *L. minor* трябва да се състоят от колонии, включващи между две и пет листовидни тела, докато здравите колонии от *L. gibba* могат да съдържат до седем листовидни тела.
18. Качеството и еднородността на използваните за изпитването растения оказват значително влияние върху резултата от изпитването и поради това растенията трябва да бъдат грижливо подбрани. Трябва да се използват млади, бързорастящи растения без видими повреди или обезцветяване (хлороза). Признак за култури с добро качество е големият брой колонии, съставени от поне две листовидни тела. Голям брой отделни листовидни тела е показателен за екологичен стрес, например ограничаване на хранителните вещества, и растителен материал от такива култури не трябва да се използва за изпитване.

Култивиране

19. За намаляване на честотата за поддръжка на културата (например когато не са планирани изпитвания с *Lemna* за известен период), културите могат да се съхраняват при намалено осветление и температура (4—10 °C). Подробности за култивирането са дадени в допълнение 3. Очевидни признаци за замърсяване с водорасли или други организми могат да изискват стерилизация на повърхността на подпроба от листообразните тела на *Lemna*, последвана от прехвърляне в прясна среда (вж. допълнение 3). В такъв случай останалата замърсена култура трябва да се изхвърли.
20. Най-малко седем дни преди изпитването достатъчно колонии се прехвърлят по стерилен начин в прясна стерилна среда и се култивират в течение на 7—10 дни при условията на изпитването.

Среда на изпитване

21. Препоръчват се различни среди за *Lemna minor* и за *Lemna gibba*, както е описано по-долу. Трябва внимателно да се прецени включването на рН буфер в средата на изпитване (MOPS — 4-морфолинпропансулфонова киселина, CAS №: 1132-61-2) в средата за *L. minor* и NaHCO_3 в средата за *L. gibba*, когато има предположения, че буферът може да реагира с изпитвания химикал и да повлияе на изразяването на неговата токсичност. Средата на Steinberg (9) също е приемлива, при условие че критериите за валидност са изпълнени.

▼ **M6**

22. За култивиране и изпитване с *L. minor* се препоръчва модификация на средата на растеж за *Lemna* по шведския стандарт (SIS). Съставът на тази среда е даден в допълнение 4.
23. Средата на растеж, 20X — ААР, както е описана в допълнение 4, се препоръчва за култивиране и изпитване с *L. gibba*.
24. Средата на Steinberg, както е описана в допълнение 4, също е подходяща за *L. minor*, но би могла да се използва и за *L. gibba*, при условие че са изпълнени критериите за валидност.

Разтвори за изпитване

25. Разтворите за изпитване обикновено се приготвят чрез разреждане на изходен разтвор. Изходните разтвори на изпитвания химикал обикновено се приготвят чрез разтваряне на химикала в среда на растеж.
26. Най-високата изпитвана концентрация на изпитвания химикал обикновено не трябва да надвишава разтворимостта във вода на химикала при условията за провеждане на изпитването. Следва да се отбележи обаче, че *Lemna* spp. плава на повърхността и може да бъде изложен на въздействието на химикали, които се събират на границата между водата и въздуха (например, слабо разтворими във вода или хидрофобни химикали или повърхностноактивни химикали). При такива обстоятелства експозицията ще произтича от материал, различен от този в разтвора, и изпитваните концентрации могат, в зависимост от характеристиките на изпитвания химикал, да надвишат разтворимостта във вода. За изпитвани химикали с малка водоразтворимост може да е необходимо да се приготви концентриран изходен разтвор или химикалът да се диспергира, като се използва органичен разтворител или диспергиращо средство, за да се улесни добавянето на точни количества от изпитвания химикал към средата на изпитване и да се подпомогне неговото диспергиране и разтваряне. Трябва да се положат всички усилия, за да се избегне използването на такива материали. Не трябва да има фитотоксичност в резултат на използването на спомагателни разтворители и диспергиращи средства. Например обичайно използваните разтворители, които не предизвикват фитотоксичност при концентрации до 100 µl/l, включват ацетон и диметилформамид. Ако се използва разтворител или диспергиращо средство, трябва да бъде отчетена неговата крайна концентрация и тя да се поддържа на минимално ниво ($\leq 100 \mu\text{l/l}$), а всички третиращи и контролни проби трябва да съдържат еднаква концентрация на разтворителя или диспергиращото средство. Допълнителни насоки относно използването на диспергиращи средства са дадени в (8).

Изпитвани и контролни групи

27. Предварителното познаване на токсичността на изпитвания химикал по отношение на *Lemna*, например от изпитване за определяне на обхват, ще помогне при избирането на подходящи изпитвани концентрации. В окончателното изпитване за токсичност обикновено би следвало да има най-малко пет изпитвани концентрации, подредени в геометрична прогресия. За предпочитане е кратността на разделяне между изпитваните концентрации да не надхвърля 3,2, но могат да се използват и по-големи стойности, при които кривата концентрация-отклик е полегата. Трябва да се представи обосновка, ако са използвани по-малко от пет концентрации. При всяка от изпитваните концентрации трябва да се използват най-малко три повторения.
28. При задаването на диапазона на изпитваните концентрации (за изпитване за определяне на обхват и/или за окончателно изпитване за токсичност), трябва да се има предвид следното:
 - за определяне на EC_x изпитваните концентрации трябва да обхващат стойността на EC_x , за да се гарантира подходяща доверителна вероятност. Например, ако се оценява EC_{50} , най-голямата изпитвана концентрация трябва да е по-голяма от стойността на EC_{50} . Ако стойността на EC_{50} попада извън диапазона на изпитваните концентрации, свързаните с нея доверителни интервали ще бъдат големи и правилната оценка за статистическата съгласуваност на модела може да не е възможна.
 - Ако целта е да се оцени LOEC/NOEC, най-ниската изпитвана концентрация трябва да е достатъчно ниска, така че растежът да не бъде значително по-малък от този на контролната проба. В допълнение, най-високата изпитвана концентрация трябва да е достатъчно висока, така че растежът да бъде значително по-нисък

▼ M6

от този в контролната проба. Ако това не е така, изпитването ще трябва да се повтори с използване на различен диапазон за концентрации (освен ако най-високата концентрация е на границата на разтворимостта или максимално изискваната пределна концентрация, например 100 mg/l).

29. Всяко изпитване трябва да включва контролни проби, състоящи се от същата хранителна среда, същия брой листовидни тела и колонии, същите условия на околната среда и процедури както при съдовете за изпитване, но без изпитвания химикал. Ако се използва спомагателен разтвор или диспергиращо средство, трябва да бъде включена допълнително контролна третирана проба, като разтворителят/диспергиращото средство трябва да присъстват в същата концентрация като тази в съдовете с изпитвания химикал. Броят на съдовете за повторни контролни проби (и съдовете с разтворител, ако е приложимо) трябва да е най-малко равен, а в идеалния случай да е два пъти по-голям от броя на съдовете, използвани за всяка изпитвана концентрация.
30. Ако не се изисква определяне на NOEC, планът за изпитването може да бъде променен, като се увеличи броят на концентрациите и се намали броят на повторенията за всяка от концентрациите. Но все пак броят на повторните контролни проби трябва да е най-малко три.

Експозиция

31. Колониите, състоящи се от 2 до 4 видими листовидни тела, се прехвърлят от инокулираната култура и се поставят на случаен принцип в съдовете за изпитване при стерилни условия. Всеки съд за изпитване трябва да съдържа общо от 9 до 12 листовидни тела. Броят на листовидните тела и колониите трябва да е еднакъв във всеки съд за изпитване. Придобитият опит за настоящия метод и данните от кръговото изпитване показват, че използването на три повторения на третиране, като всяко повторение съдържа в началото от 9 до 12 листовидни тела, е достатъчно за откриването на различия в растежа от приблизително 4 до 7 % от потискането, изчислено чрез скоростта на растежа (10 до 15 %, изчислени чрез добива) между третираните проби (7).
32. За минимизиране на влиянието на пространствените различия в интензитета на светлината и температурата се изисква схема за случаен подбор за разполагане на съдовете за изпитване в инкубатора. При извършване на наблюдения също се изискват блокова схема или промяна на разполагането чрез случаен подбор (или по-честа промяна на разполагането).
33. Ако предварителното изпитване за стабилност показва, че концентрацията на изпитвания химикал не може да бъде поддържана (т.е., измерената концентрация пада под 80 % от първоначално измерената концентрация) за времето на изпитването (7 дни), се препоръчва полустатичен режим на изпитване. В този случай колониите трябва да бъдат експонирани в прясно приготвени разтвори за изпитване и за контролни проби най-малко два пъти по време на изпитването (например, ден 3 и 5). Честотата на експониране в прясна среда ще зависи от стабилността на изпитвания химикал; може да е необходима по-голяма честота, за да се поддържа почти постоянна концентрация за силно нестабилни или летливи вещества. При някои обстоятелства може да се изисква процедура с протичане (8)(10).
34. Сценарият на експозиция чрез прилагане към листата (пръскане) не е включен в настоящия метод за изпитване; вместо това вж. (11).

Условия за инкубиране

35. Трябва постоянно да се използва топло или студено бяло флуоресцентно осветление, за да се осигури интензитет на светлината в диапазона $85\text{—}135 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, когато се измерва във фотосинтетично активно излъчване (400—700 nm) в точки, чието разстояние от източника на светлина е еднакво с това на листовидните тела на *Letma* (еквивалентно на 6 500—10 000 lux). Разликите от избрания интензитет на светлината върху площта на изпитването не трябва да нахвърлят $\pm 15\%$. Методът за засичане и измерване на светлината, особено видът на сензора, ще оказват влияние върху измерваната стойност. Сферичните сензори (които реагират на светлина, излъчвана

▼ M6

от всички ъгли над и под равнината на измерване) и „косинусовите“ сензори (които реагират на светлината, излъчвана от всички ъгли над равнината на измерване), са за предпочитане пред еднопосочните сензори и ще отчитат по-високи стойности за описания тук тип многоточков източник на светлина.

36. Температурата в съдовете за изпитване трябва да бъде 24 ± 2 °C. Стойността на рН на контролната среда не трябва да се повишава с повече от 1,5 единици по време на изпитването. Въпреки това, отклонение с повече от 1,5 единици не прави изпитването невалидно, при условие че може да се покаже, че критериите за валидност са изпълнени. Необходимо е да се обърне допълнително внимание на отклонението в стойността на рН в някои специални случаи, например когато се изпитват нестабилни химикали или метали. Вж. (8) за допълнителни насоки.

Продължителност

37. Изпитването се прекратява 7 дни след прехвърлянето на растенията в съдовете за изпитване.

Измервания и аналитични определяния

38. В началото на изпитването се преброяват листовидните тела в съдовете за изпитване и броят им се записва, като се внимава да бъде гарантирано отчитането на подаващите се, ясно видими листовидни тела. Броят на листовидните тела, които изглеждат нормални или аномални, следва да се определи в началото на изпитването, най-малко веднъж на всеки 3 дни по време на експозицията (т.е. в най-малко 2 случая по време на 7-дневния период), както и при завършване на изпитването. Трябва да бъдат отбелязани промените в развитието на растението, например в размера на листовидните тела, външния вид, показания за некроза, хлороза или издутост, разпадане на колонията или загуба на плавателността, както и в дължината и външния вид на корените. Трябва да се отбележат и значими характеристики на средата на изпитване (например наличието на неразтворен материал, растеж на водорасли в съда за изпитване).
39. В допълнение към определянето на броя на листовидните тела по време на изпитването, трябва да се оценят и въздействията на изпитвания химикал върху една (или повече) от следните измервани променливи:
- обща площ на листовидните тела,
 - сухо тегло,
 - свежо тегло.
40. Общата площ на листовидните тела има предимство, че може да се определи за всеки изпитван и контролен съд в началото, по време и в края на изпитването. Сухото или свежото тегло трябва да се определят в началото на изпитването от проба на инокулираната култура, представителна по отношение това, което се използва за начало на изпитването, както и в края на изпитването с растителен материал от всеки съд за изпитване и всеки контролен съд. Ако не се измерва площта на листовидните тела, за предпочитане е сухото пред свежото тегло.
41. Общата площ на листовидните тела, сухото тегло и свежото тегло могат да бъдат определени, както следва:
- Обща площ на листовидните тела:* Общата площ на листовидните тела на всички колонии може да се определи чрез анализ на изображенията. Силуетите на съда за изпитване и растенията могат да се уловят с помощта на видеокамера (т.е. чрез поставянето на съда върху светлопроницаема кутия) и полученото изображение да се дигитализира. Чрез калибриране с плоски форми с известна площ след това може да се определи общата площ на листовидните тела в съда за изпитване. Трябва да се вземат мерки за изключване на интерференцията, предизвикана от ръба на съда за изпитване. Алтернативен, но по-трудоемък подход е да се фотографират съдовете за изпитване и растенията, да се изреже полученият силует на колонии и да се определи тяхната площ с помощта на анализатор на площта на листата или с разграфена хартия. И други техники (например отношението на теглата на хартията с площта на силуета на колонии и тази с единица площ) може също да са подходящи.

▼ M6

- ii) *Сухо тегло*: Всички колонии се събират от всеки съд за изпитване и се изплакват с дестилирана или дейонизирана вода. Те се попиват за отстраняване на излишната вода и след това се изсушават при 60 °C до постоянно тегло. Всички части на корени трябва да се включат. Сухото тегло трябва да бъде изразено с точност най-малко 0,1 mg.
- iii) *Свежо тегло*: Всички колонии се прехвърлят в предварително претеглени полистиренови (или направени от друг инертен материал) епруветки с малки (1 mm) дупки в заоблената долна част. След това епруветките се центрофугират при 3 000 rpm в течение на 10 минути при стайна температура. Епруветките, които сега съдържат изсушените колонии, се измерват отново и свежото тегло се пресмята чрез изваждането на теглото на празната епруветка.

Честота на измерванията и аналитичните определяния

- 42. Ако се използва схема за статично изпитване, рН на всяка третирана проба трябва да се измери в началото и в края на изпитването. Ако се използва схема за полустатично изпитване, рН трябва да се измерва във всяка партида от „свеж“ разтвор за изпитване преди всяко подновяване, както и в съответните „изчерпани“ разтвори.
- 43. Интензитетът на светлината трябва да се измерва в климатичната камера, в инкубатора или помещението в точки, които са на разстояние от източника на светлина, което е еднакво с това на листовидните тела на *Lemna*. Измерванията трябва да се извършват най-малко веднъж по време на изпитването. Температурата на средата в заместващия съд, който се държи при същите условия в климатичната камера, инкубатора или помещението, трябва да се записва най-малко веднъж дневно.
- 44. По време на изпитването концентрациите на изпитвания химикал се определят през подходящи интервали. При статични изпитвания минималното изискване е концентрациите да се определят в началото и в края на изпитването.
- 45. При полустатични изпитвания, при които концентрацията на изпитвания химикал не се очаква да остане в рамките на $\pm 20\%$ от номиналната концентрация, е необходимо да се анализират всички пряно приготвени изпитвани разтвори и същите разтвори при всяко обновяване (вж. точка 33). Обаче при тези изпитвания, при които измерената начална концентрация на изпитвания химикал не е в рамките на $\pm 20\%$ от номиналната, но за които може да се предоставят достатъчно доказателства, показващи че началните концентрации са повторяеми и стабилни (т.е., в диапазона 80—120 % от началната концентрация), химичните определяния могат да се извършват само за най-високата и най-ниската изпитвана концентрация. Във всички случаи определянето на концентрациите на изпитвания химикал преди обновяването е необходимо да се извършва само за един съд с повторение, за всяка изпитвана концентрация (или съдържанието на съдовете, обединени в пул от повторения).
- 46. Ако се използва проточно изпитване, подходящ е режим за взимане на проби, подобен на описания при полустатичните изпитвания, включително анализа в началото, по средата и в края на изпитването, но измерванията на „изчерпаните“ разтвори в този случай не са подходящи. В този тип на изпитване скоростта на потока на разредителя и изпитвания химикал или изходния разтвор на изпитвания химикал трябва да се проверяват ежедневно.
- 47. Ако има доказателство, че през цялото време на изпитването концентрацията на химикала, който се изпитва, е била задоволително поддържана в рамките на $\pm 20\%$ от номиналната или измерената първоначална концентрация, анализът на резултатите може да бъде базиран на номиналната или на измерената първоначална стойност. Ако отклонението от номиналната или измерената първоначална концентрация не е в рамките на $\pm 20\%$, анализът на резултатите трябва да се базира на средногеометричната стойност на концентрацията по време на експозицията или на модели, които описват намаляването на концентрацията на изпитвания химикал (8).

▼ **M6****Гранично изпитване**

48. При определени условия, например когато предварителното изпитване показва, че изпитваният химикал няма токсични въздействия при концентрации до 100 mg/l или до неговата граница на разтворимост в изпитваната среда (в зависимост от това кое е по-ниско), може да бъде осъществено гранично изпитване, включващо сравнение на отклика в контролна група и в една от третираните групи (100 mg/l или концентрация, равна на границата на разтворимост). Настоятелно се препоръчва това да бъде подкрепено с анализ на концентрацията на експозиция. Всички предходни условия на изпитване и критерии за валидност се прилагат и за гранично изпитване, с изключение на това, че броят на третираните повторни проби трябва да се удвои. Растежът в контролната и третираната група може да се анализира чрез използване на статистическо изпитване за сравняване на средните стойности, например t-тест на Стюдънт.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Време за удвояване**

49. За определяне на времето за удвояване (T_d) на броя на листовидните тела и придържането към този критерий за валидност при изследването (точка 12) се използва следната формула с данните, получени от контролните съдове:

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

където μ е средната специфична скорост на растеж, определена според описанието в точки 54—55.

Зависими променливи

50. Целта на изпитването е да се определят въздействията на изпитвания химикал върху вегетативния растеж на *Lemna*. Настоящият метод за изпитване описва две зависими променливи, тъй като различните юрисдикции имат различни предпочитания и регулаторни нужди. За да се приемат резултатите от изпитването във всички държави членки, въздействията следва да се оценяват с използването и на двете зависими променливи а) и б), описани по-долу.

а) *Средна специфична скорост на растеж*: тази зависима променлива се изчислява на базата на промените в логаритмите на броя на листовидните тела и, допълнително, на базата на промените в логаритмите на друг измерван параметър (обща площ на листовидните тела, сухо тегло или свежо тегло) с течение на времето (изразено в дни) в контролните проби и във всяка група с третираните проби. Понякога тя се нарича относителна скорост на растеж (12).

б) *Добив*: тази зависима променлива се изчислява на базата на промените в броя на листовидните тела и, допълнително, на базата на промените в логаритмите на друг измерван параметър (обща площ на листовидните тела, сухо тегло или свежо тегло) в контролните проби и във всяка група с третираните проби до края на изпитването.

51. Следва да се отбележи, че стойностите на токсичността, изчислени с помощта на тези две зависими променливи, не са сравними и тази разлика трябва да се разпознава, когато се използват резултатите от изпитването. Стойностите на EC_x , базирани на средната специфична скорост на растеж ($E_r C_x$), по правило ще бъдат по-високи от резултатите, базирани на добива ($E_y C_x$), ако се придържате към условията за изпитване на настоящия метод за изпитване, което се дължи на математическата основа на съответните подходи. Това не трябва да се интерпретира като разлика в чувствителността между двете зависими променливи — стойностите просто са различни от математическа гледна точка. Концепцията за средната специфична скорост на растеж се основава на общия експоненциален модел за растежа на водната леща в неограничени култури, където токсичността се оценява на базата на въздействието върху скоростта на растежа, без да зависи от абсолютното ниво на специфичната скорост на растеж на контролната проба, от наклона на кривата на концентрация-отклик или продължителността на изпитването. Противоположно на това, резултатите, базирани на зависимата променливата за добива, зависят от всички тези други променливи. $E_y C_x$ зависи от специфичната скорост на растеж на вида водна леща, използван във всяко от изпитванията, и

▼ M6

от максималната специфична скорост на растеж, която може да варира между видовете и дори между различните клонове. Тази зависима променлива не следва да се използва за сравняване на чувствителността към токсични вещества между видовете водна леща и дори различните клонове. Докато използването на средната специфична скорост на растеж за оценяване на токсичността е за предпочитане от научна гледна точка, оценките за токсичността, базирани на добива, също са включени в настоящия метод за изпитване, за да удовлетворят действащите регулаторни изисквания в някои юрисдикции.

52. Оценките за токсичността трябва да са базирани на броя на листовидните тела и на още една допълнителна измервана променлива (обща площ на листовидните тела, сухо тегло или свежо тегло), тъй като някои химикали могат да въздействат на други измервани променливи много повече, отколкото на броя на листовидните тела. Това въздействие не може да бъде открито само чрез изчисляване на броя на листовидните тела.
53. Броят листовидни тела, както и всяка друга записана измервана променлива, т.е., общата площ на листовидните тела, сухото тегло или свежото тегло, се представят в табличен вид заедно с концентрациите на изпитвания химикал за всеки измерван случай. Последващият анализ на данни, например оценяването на LOEC, NOEC или ЕС_x, трябва да се основава на стойностите за отделните повторения, а не на изчислените средни стойности за група третирани проби.

Средна специфична скорост на растеж

54. Средната специфична скорост на растеж за определен период се изчислява като логаритмичното нарастване в променливите за растеж — брой на листовидните тела и още една измервана стойност (обща площ на листовидните тела, сухо тегло или свежо тегло) — като се използва формулата, дадена по-долу, за всяко повторение на контролната проба и третираните проби:

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

където:

- μ_{i-j} : средна специфична скорост на растеж за времето от i до j
- N_i : измервана променлива в съда за изпитване или в контролния съд в момента от време i
- N_j : измервана променлива в съда за изпитване или в контролния съд в момента от време j
- t : времеви интервал от i до j

Изчислява се средната стойност на скоростта на растеж заедно с оценки на дисперсията за всяка група третирани проби и контролна група.

55. Средната специфична скорост на растеж трябва да се изчисли за целия период на изпитване (времето „ i “ в горната формула е началото на изпитването, а времето „ j “ е края на изпитването). За всяка изпитвана и контролна концентрация се изчислява средната стойност на скоростта за растеж заедно с оценките на дисперсията. Допълнително трябва да се оцени скоростта на растеж сектор по сектор с цел да се оценят въздействията на изпитвания химикал, които възникват в периода на експозиция (например чрез проверка на логаритмично преобразуваните криви на растежа). Значителните различия между скоростта на растеж по сектори и средната скорост на растеж показват, че е налице отклонение от постоянния експоненциален растеж и че има основание за внимателна проверка на кривите на растежа. В този случай консервативният подход ще бъде да се сравнят специфичните скорости на растежа на третираните култури в течение на времеви интервал на максимално потискане с тези за контролните проби за същия времеви интервал.
56. Процентът на потискане на скоростта на растежа (I_r) тогава може да се изчисли за всяка изпитвана концентрация (група от третирани проби) съгласно следната формула:

▼ **M6**

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

където:

- % I_r : процентно потискане в средната специфична скорост на растеж
- μ_C : средна стойност на μ в контролата
- μ_T : средна стойност на μ в третираната група

Добив

57. Въздействията върху добива се определят на базата на две измервани променливи, броя на листовидните тела и още една измервана променлива (обща площ на листовидните тела, сухо тегло или свежо тегло), които присъстват във всеки съд за изпитване в началото и в края на изпитването. За сухото тегло или свежото тегло началната биомаса се определя на базата на проба от листовидни тела, взета от същата партида, която е използвана за инокулацията на съдовете за изпитване (вж. точка 20). За всяка изпитвана концентрация и контрола се изчислява средната стойност на добива, заедно с оценките на дисперсията. Процентното потискане на добива (% I_y) може да се изчисли за всяка третирана група, както следва:

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

където:

- % I_y : процентното намаление на добива
- b_c : крайната биомаса минус началната биомаса за контролната група
- b_T : крайната биомаса минус началната биомаса в групата от третираните проби

Построяване на кривите концентрация-отклик

58. Трябва да се построят кривите концентрация-отклик, които свързват средното процентно потискане на зависимата променлива (I_r или I_y , изчислени както е показано в точка 56 или 57) и логаритъма на концентрацията на изпитвания химикал.

Оценка на EC_x

59. Оценките на EC_x (например EC_{50}) следва да се базират както на средната специфична скорост на растеж ($E_r C_x$), така и на добива ($E_y C_x$), като всяка от тези стойности от своя страна следва да се основава на броя на листовидните тела и една допълнителна измервана променлива (обща площ на листовидните тела, сухо тегло или свежо тегло). Това е така, тъй като има изпитвани химикали, които оказват различно въздействие върху броя на листовидните тела и други измервани променливи. Следователно исканите параметри за токсичност са четири стойности на EC_x за всяко изчислено ниво x на потискане на растежа: $E_r C_x$ (брой на листовидните тела); $E_r C_x$ (обща площ на листовидните тела, сухо тегло или свежо тегло); $E_y C_x$ (брой на листовидните тела); и $E_y C_x$ (обща площ на листовидните тела, сухо тегло или свежо тегло).

Статистически процедури

60. Целта е да се получи количествено съотношение концентрация-отклик чрез регресионен анализ. Може да се използва претеглена линейна регресия след извършване на линеаризираща трансформация на данните от отклика — например в пробит, или логит, или Вейбул единици (13), но предпочитаните процедури са тези на нелинейната регресия, които по-добре обработват неизбежните неравномерности и отклонения от гладките разпределения. При приближаване на нула или пълно инхибиране подобни неравномерности може да бъдат увеличени от трансформацията, като по този начин пречат на анализа (13). Следва да се отбележи, че стандартните методи на анализ с помощта на пробит,

▼ **M6**

логит или Вейбул трансформации са предназначени за използване при двоични данни (например смъртност или преживяване) и трябва да бъдат изменени, за да се приспособят към данните за скоростта на растежа или добива. Специфични процедури за определяне на стойности на EC_x от непрекъснати данни могат да се намерят в (14), (15) и (16).

61. За анализа на всяка от зависимите променливи се използва съотношението концентрация-отклик, за да се изчислят точковите оценки на стойностите на EC_x . По възможност трябва да се определят 95 %-ни доверителни граници за всяка от оценките. Съгласието на данните от отклика с регресионния модел следва да се оцени графично или статистически. Регресионният анализ трябва да се извърши, като се използват отклиците при индивидуалните повторения, а не средните стойности за групите от третирани проби.
62. Оценките на EC_{50} и доверителните граници могат да се получат също и чрез използване на линейна интерполация с bootstrap процедура (17), ако наличните регресионни модели/методи са неподходящи за данните.
63. За оценяване на LOEC и следователно на NOEC е необходимо да се сравнят средните стойности на третирана проба, като се използват техники за дисперсионен анализ (ANOVA). Средната стойност за всяка концентрация след това трябва да се сравни със средната стойност на контролна проба с помощта на съответния метод за множествени сравнения или трендов тест. Могат да се използват тестовете на Дънет или на Уйлямс (18)(19)(20)(21). Необходимо е да се оцени дали е удовлетворено допускането при ANOVA за хомогенност на дисперсията. Тази оценка може да се извърши графично или чрез формален тест (22). Подходящи са тестовете на Левин или на Бартлет. Невъзможността за удовлетворяване на допускането за хомогенност на дисперсиите понякога може да се коригира чрез логаритмична трансформация на данните. Ако хетерогенността на дисперсията е екстремална и не може да се коригира чрез трансформация, следва да се обмисли анализ с методи като теста на Йонкхере за определяне на тренд със стъпка назад. Допълнителни насоки относно определянето на NOEC могат да се намерят в (16).
64. В най-новите научни разработки е дадена препоръка концепцията за NOEC да бъде изоставена и заменена с базирани на регресия точкови оценки на EC_x . Не е установена подходяща стойност на x за това изпитване на *Lemna*. Изглежда обаче, че диапазонът от 10 до 20 % е подходящ (в зависимост от избраната зависима променлива) и се предпочита да бъде отчетена както EC_{10} , така и EC_{20} .

Протоколиране

65. В протокола от изпитването се включва следното:

Изпитван химикал:

- физична природа, физични и химични свойства, включително граница на водоразтворимост;
- данни за идентификацията на химикала (например CAS номер), включително чистота (онечиствания).

Изпитван биологичен вид:

- научно наименование, клон (ако е известен) и източник.

Условия на изпитване:

- използвана процедура на изпитване (статична, полустатична или проточна);
- дата на началото на изпитването и неговата продължителност;
- среда на изпитване;
- описание на плана на проучването: съдове за изпитване и капацитет, обем на разтворите, брой колонии и листовидни тела за един съд за изпитване в началото на изпитването;
- изпитвани концентрации (съответно номинална и измерена) и брой на повторенията за една концентрация;

▼ **M6**

- методи за приготвяне на изходните и изпитваните разтвори, включително използването на всякакви разтворители или диспергиращи средства;
- температура по време на изпитването;
- източник на светлина, интензитет на светлината и хомогенност;
- стойности на рН за изпитваните и контролните среди;
- концентрации на изпитвания химикал и метод за анализ със съответните данни за оценка на качеството (изследвания за валидиране, стандартни отклонения или доверителни граници на анализите);
- методи за определяне на броя на листовидните тела и други измервани променливи, например сухо тегло, свежо тегло или площ на листовидните тела;
- всички отклонения от настоящия метод за изпитване.

Резултати:

- необработени данни: брой листовидни тела и други измервани променливи във всеки съд за изпитване и контролен съд при всяко наблюдение и извършен анализ;
- средни стойности и стандартни отклонения за всяка измервана променлива;
- криви на растежа за всяка концентрация (препоръчително с логаритмично преобразувана измервана стойност, вж. точка 55);
- време за удвояване/скорост на растеж в контролната проба на базата на броя листовидни тела;
- изчислените зависими променливи за всяко третирано повторение, със средни стойности и коефициент на вариация за повторенията;
- графично представяне на взаимовръзката концентрация-отклик;
- оценки на токсичността за зависимите променливи, например EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀, и свързаните доверителни интервали. Ако са изчислени, LOEC и/или NOEC и статистическите методи, използвани за тяхното определяне;
- ако е използван ANOVA, мащабът на въздействието, което може да се открие (например най-малката значима разлика);
- всяка стимулация на растеж, открита в която и да е третирана проба;
- всякакви визуални признаци за фитотоксичност, както и наблюдения на изпитваните разтвори;
- обсъждане на резултатите, включително всякакво влияние върху резултата от изпитването, вследствие на отклонения от настоящия метод за изпитване.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.
- (2) US EPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96-156. 8pp.
- (3) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.
- (4) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

▼ M6

- (5) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 — 120 pp.
- (6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.
- (7) Sims I., Whitehouse P. and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.
- (8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (9) International Organisation for Standardisation. ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.
- (10) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.
- (11) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353 — 359.
- (12) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.
- (13) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.
- (14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.
- (15) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.
- (16) OECD. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
- (18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096-1121.
- (19) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.
- (20) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
- (21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 519-531.
- (22) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼ **M6**

Допълнение 1

Определения

За целите на настоящия метод на изпитване се използват следните определения и съкращения:

Биомаса е сухото тегло на живите организми, съдържащи се в една популация. В настоящото изпитване обичайно се измерват сурогати на биомасата, като броят листовидни тела или площта на листовидните тела, и поради това използването на термина „биомаса“ се отнася също и за посочените измервания на сурогати.

Химикал означава вещество или смес.

Хлороза е пожълтяване на тъканта на листовидните тела.

Клон е организъм или клетка, получен от един индивид чрез безполово възпроизвеждане. Следователно, индивидите от един и същи клон са генетично идентични.

Колония означава съвкупност от майчини и дъщерни листовидни тела (обикновено от 2 до 4), закрепени едно към друго. Понякога се посочва като растение.

ES_x е концентрацията на изпитвания химикал, разтворен в изпитваната среда, която води до *x* % (например 50 %) намаляване на растежа на *Letna* в рамките на определен период на експозиция (който трябва да бъде посочен изрично, ако се отклонява от пълната или нормалната продължителност на изпитването). С оглед на еднозначно обозначаване на стойността на ES, изведена от скоростта на растежа или от добива, символът „E_rC“ се използва за скоростта на растежа, а „E_yC“ се използва за добива, следван от използваната измервана променлива, например E_rC (брой листовидни тела).

Проточно изпитване е изпитване, при което изпитваните разтвори се подменят постоянно.

Листовидно тяло е отделна/единична „листообразна“ структура на растението водна леща. Това е най-малката единица, т.е., годен за размножаване индивид.

Издутост означава листовидни тела, чийто външен вид е изпъкнал или набъбнал.

Растеж е нарастване на измерваната променлива, например на броя на листовидните тела, сухото тегло, свежото тегло или площта на листовидните тела през периода на изпитване.

Скорост на растеж (средна специфична скорост на растеж) е логаритмичното нарастване на биомасата през периода на експозиция.

Най-ниска концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC) е най-ниската изпитвана концентрация, при която за химикала се наблюдава статистически значимо въздействие за забавяне на растежа (при $p < 0,05$) в сравнение с контролната проба, в рамките на дадено време на експозиция. При все това, всички изпитвани концентрации над LOEC трябва да имат вредно въздействие, равно или по-голямо от наблюдаваното при LOEC. Когато тези две условия не могат да бъдат удовлетворени, трябва да се даде пълно обяснение за това как е била избрана LOEC (и следователно NOEC).

Измервани променливи са всички видове променливи, които се измерват с цел да се изрази крайната точка на изпитването с помощта на една или няколко различни зависими променливи. При настоящия метод измерваните променливи са броят на листовидните тела, площта на листовидните тела, свежото тегло и сухото тегло.

Монокултура е култура с един растителен вид.

Некроза е мъртва (т.е. бледа или просмукана с вода) тъкан на листовидно тяло.

Концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC) е изпитваната концентрация непосредствено под LOEC.

Фенотип са наблюдаемите характеристики на един организъм, определени от взаимодействието на неговите гени и неговата околна среда.

Зависими променливи са променливите за оценяване на токсичността, изведени от произволни измервани променливи, описващи биомасата, с помощта на различни методи за изчисление. При настоящия метод за изпитване скоростите на растежа и добивът са зависими променливи, изведени от измервани променливи като брой листовидни тела, площ на листовидните тела, свежо тегло или сухо тегло.

▼ M6

Полустатично (обновяемо) изпитване е изпитване, при което изпитваният разтвор периодично се подменя на определени интервали по време на изпитването.

Статично изпитване е метод за изпитване без обновяване на изпитвания разтвор по време на изпитването.

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

Крайна точка на изпитване описва като цел на изпитването общия показател, който ще бъде изменен от изпитвания химикал в сравнение с контролната проба. При настоящия метод крайната точка на изпитването е потискането на растежа, което може да се изрази чрез различни зависими променливи на базата на една или повече измервани променливи.

Среда на изпитване е напълно синтетичната среда на растеж, върху която растат изпитваните растения, когато са подложени на въздействието на изпитвания химикал. Изпитваният химикал обикновено се разтваря в средата на изпитване.

Добив е стойността на измервана променлива, чрез която се изразява биомасата в края на периода на експозиция минус измерваната променлива в началото на периода на експозиция.

▼ M6

Допълнение 2

Описание на *Lemna* spp.

Водното растение *Lemna* spp., обикновено наричано водна леща, принадлежи към семейство Lemnaceae, което има няколко вида в четири рода, разпространени в целия свят. Техният различен външен вид и таксономия са описани изчерпателно в (1)(2). *Lemna gibba* и *L. minor* са представители на вида в умерените области и обикновено се използват за изпитвания за токсичност. И двата вида имат плаващо или потопено във водата дисковидно стъбло (листовидно тяло), много тънък корен излиза от центъра на долната повърхност на всяко листовидно тяло. *Lemna* spp. рядко дава цвят и растенията се размножават чрез вегетативно създаване на нови листовидни тела (3). В сравнение с по-възрастните растения младите са по-бледи, имат по-къси корени и се състоят от две до три листовидни тела с различни размери. Малкият размер на *Lemna*, опростената му структура, безполовото размножаване и краткото време за създаване на поколение правят растенията от този род много подходящи за лабораторни изпитвания (4)(5).

Поради възможно междувидово вариране по отношение на чувствителността, валидни са сравнения на чувствителността единствено в рамките на един вид.

Примери за видове от род *Lemna*, които са били използвани за изпитване:
Референция за биологичните видове

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

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

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

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

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

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

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

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

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

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

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

Sources of *Lemna* species

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria

Department of Botany, University of Toronto

Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2

Tel: +1-416-978-3641

Fax: +1-416-978-5878

e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca

▼ M6

North Carolina State University

Forestry Dept

Duckweed Culture Collection

Campus Box 8002

Raleigh, NC 27695-8002

United States

phone 001 (919) 515-7572

astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University

SE-106 91

STOCKHOLM

SWEDEN

Tel: +46 8 674 7240

Fax +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)

FG III 3.4

Schichauweg 58

12307 Berlin

Germany

e-mail: lemna@uba.de

ЛИТЕРАТУРА

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

▼ **M6***Допълнение 3***Поддържане на изходната култура**

Изходните култури могат да бъдат поддържани при по-ниски температури (4—10 °C) за продължителни периоди, без да има нужда да бъдат възстановявани. Средата на растеж на *Lemma* може да е същата като тази, използвана за изпитването, но за изходните култури може да се използва друга богата хранителна среда.

Периодично няколко млади, светлозелени растения се прехвърлят с помощта на асептична техника в нови съдове за култури, които съдържат прясна среда. При предложените тук по-студени условия субкултивирането може да се провежда на интервали до три месеца.

Трябва да се използват почистени по химичен път (промити с киселина) и стерилни стъклени съдове за културите, както и да се прилагат асептични техники за манипулиране. При замърсяване на изходната култура, например с водорасли или гъби, е необходимо да се вземат мерки за премахване на замърсяващите организми. При замърсяване с водорасли и повечето други замърсяващи организми това може да се постигне с повърхностна стерилизация. Взима се проба със замърсен растителен материал и корените се отрязват. След това материалът се разклаща енергично и после се потапя в 0,5 % (v/v) разтвор на натриев хипохлорит за период между 30 секунди и 5 минути. След това растителният материал се изплаква със стерилна вода и се прехвърля на няколко партиди в съдове за култури, съдържащи прясна среда на растеж. В резултат на тази обработка, много от листовидните тела ще умрат, особено ако се използват по-дълги периоди на експозиция, но някои от преживелите обикновено не са замърсени. Те биха могли след това да се използват за повторно инокулиране на нови култури.

▼ **M6**

Допълнение 4

Среди

За *L. minor* и *L. gibba* се препоръчват различни среди на растеж. За *L. minor* се препоръчва среда, модифицирана съгласно шведски стандарт (SIS), докато за *L. gibba* се препоръчва среда 20X AAR. Съставът на двете среди е даден по-долу. При приготвянето на тези среди следва да се използват реактиви или химикали с чистота „чист за анализ“, както и дейонизирана вода.

Среда на растеж за *Letna* съгласно шведски стандарт (SIS)

- Изходните разтвори I — V се стерилизират чрез обработка в автоклав (120 °C, 15 минути) или чрез мембранно филтруване (размер на порите приблизително 0,2 µm).
- Изходният разтвор VI (и по избор VII) се стерилизират само чрез мембранно филтруване; те не трябва да се обработват в автоклав.
- Стерилните изходни разтвори трябва да се съхраняват на студено и тъмно. Изходните разтвори I — V трябва да се изхвърлят след шест месеца, докато изходният разтвор VI (и по избор VII) имат срок на съхранение един месец.

№ на изходен разтвор	Вещество	Концентрация в изходния разтвор (g/l)	Концентрация в приготвената среда (mg•l)	Приготвена среда	
				Елемент	Концентрация (mg•l)
I	NaNO ₃	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH ₂ PO ₄	1,3	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	CaCl ₂ · 2H ₂ O	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na ₂ CO ₃	4,0	20	C	2,3
V	H ₃ BO ₃	1,0	1,00	B	0,17
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,010	0,010	Mo	0,0040
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,050	0,050	Zn	0,011
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na ₂ -EDTA 2H ₂ O	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (буфер)	490	490	—	—

За приготвянето на един литър среда съгласно SIS към 900 ml дейонизирана вода се добавят следните съставки:

▼ **M6**

- 10 ml от изходен разтвор I
- 5 ml от изходен разтвор II
- 5 ml от изходен разтвор III
- 5 ml от изходен разтвор IV
- 1 ml от изходен разтвор V
- 5 ml от изходен разтвор VI
- 1 ml от изходен разтвор VII (по избор)

Забележка: Може да е необходим допълнителен изходен разтвор VII (буфер MOPS) за определени изпитвани химикали (вж. точка 11).

Стойността на рН се регулира до $6,5 \pm 0,2$ с 0,1 или 1 mol HCl или NaOH, а обемът се регулира до един литър с дейонизирана вода.

Среда на растеж 20X ААР

Изходните разтвори се приготвят в стерилна дестилирана или дейонизирана вода.

Стерилните изходни разтвори трябва да се съхраняват на студено и тъмно. При тези условия изходните разтвори ще имат срок на съхранение най-малко 6—8 седмици.

Пет хранителни изходни разтвора (А1, А2, А3, В и С) се приготвят за средата 20X — ААР с помощта на химикали с квалификация „химически чист“. Обем от 20 ml от всеки хранителен изходен разтвор се добавя към приблизително 850 ml дейонизирана вода за изготвяне на средата на растеж. Стойността на рН се регулира до $7,5 \pm 0,1$ с 0,1 или 1 mol HCl или NaOH, а обемът се регулира до един литър с дейонизирана вода. След това средата се филтрува през мембранен филтър с 0,2 μm (приблизително) в стерилен контейнер.

Средата на растеж, предназначена за изпитването, трябва да се приготви 1—2 дни преди да се използва, за да се даде възможност на рН да се стабилизира. Стойността на рН в средата на растеж трябва да се провери преди да се използва и при необходимост да се регулира отново чрез добавяне на 0,1 или 1 mol NaOH или HCl, както е описано по-горе.

№ на изходен разтвор	Вещество	Концентрация в изходния разтвор (g/l) (*)	Концентрация в приготвената среда (mg/l) (*)	Приготвена среда	
				Елемент	Концентрация (mg/l) (*)
А1	NaNO ₃	26	510	Na;N	190;84
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	12	240	Mg	58,08
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	4,4	90	Ca	24,04
А2	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	290	S	38,22
А3	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ · O	1,4	30	K;P	9,4;3,7
В	H ₃ BO ₃	0,19	3,7	B	0,65
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,42	8,3	Mn	2,3
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,16	3,2	Fe	0,66

▼ M6

№ на изходен разтвор	Вещество	Концентрация в изходния разтвор (g/l) (*)	Концентрация в приготвената среда (mg/l) (*)	Приготвена среда	
				Елемент	Концентрация (mg/l) (*)
	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0,30	6,0	—	—
	ZnCl ₂	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	NaHCO ₃	15	300	Na ₂ C	220; 43

(*) освен ако не е посочено

Забележка: Подходящата от теоретична гледна точка крайна концентрация на бикарбонат (при която ще се избегне съществено регулиране на стойността на pH) е 15 mg/l, а не 300 mg/l. Данните за минали периоди за ползването на средата 20X-AAP обаче, включително при кръговото изпитване за настоящия метод, се базират на 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemma* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.)

Среда на Steinberg (съгласно ISO 20079)

Концентрации и изходни разтвори

Модифицираната среда на Steinberg се използва в ISO 20079 само за *Lemma minor* (тъй като там се разрешава само *Lemma minor*), но изпитванията са показали, че могат да се постигнат добри резултати също и с *Lemma gibba*.

При приготвяне на средата трябва да се използват реактиви или химикали с аналитично качество и дейонизирана вода.

Хранителната среда се приготвя от изходни разтвори или 10-кратно концентрирана среда, която позволява максимална концентрация на средата без утаяване.

Таблица 1

pH-стабилизирана среда на Steinberg (модифицирана съгласно Altenburger)

Компонент		Хранителна среда	
Макроелементи	mol маса	mg/l	mmol/l
KNO ₃	101,12	350,00	3,46
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236,15	295,00	1,25
KH ₂ PO ₄	136,09	90,00	0,66
K ₂ HPO ₄	174,18	12,60	0,072
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,37	100,00	0,41

▼ **M6**

Компонент		Хранителна среда	
Микроелементи	mol маса	µg/l	µmol/l
H ₃ BO ₃	61,83	120,00	1,94
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,43	180,00	0,63
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241,92	44,00	0,18
MnCl ₂ · 4H ₂ O	197,84	180,00	0,91
FeCl ₃ · 6H ₂ O	270,21	760,00	2,81
Динатриев етилендиаминотетраацетат дихидрат	372,24	1 500,00	4,03

Таблица 2

Исходни разтвори (макроелементи)

1. Макроелементи (50-кратно концентрирани)	g/l
Исходен разтвор 1:	
KNO ₃	17,50
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
Исходен разтвор 2:	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,00
Исходен разтвор 3:	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	14,75

Таблица 3

Исходни разтвори (микроелементи)

2. Микроелементи (1 000-кратно концентрирани)	mg/l
Исходен разтвор 4:	
H ₃ BO ₃	120,0
Исходен разтвор 5:	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180,0
Исходен разтвор 6:	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44,0
Исходен разтвор 7:	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,0
Исходен разтвор 8:	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	760,00
Динатриев етилендиаминотетраацетат дихидрат	1 500,00

— Исходните разтвори 2 и 3 и отделно разтворите от 4 до 7 могат да бъдат обединени (като се вземат под внимание изискуемите концентрации).

▼ M6

- За по-дълъг срок на съхранение изходните разтвори се обработват в автоклав при 121 °C в течение на 20 минути или алтернативно се извършва стерилно филтруване (0,2 µm). За изходен разтвор 8 настоятелно се препоръчва стерилно филтруване (0,2 µm).

Приготвяне на крайната концентрация на средата на Steinberg (модифицирана)

- Добавят се 20 ml от изходни разтвори 1, 2 и 3 (вж. таблица 2) към около 900 ml дейонизирана вода, за да се избегне утаяването.
- Добавят се 1,0 ml от изходни разтвори 4, 5, 6, 7 и 8 (вж. таблица 3).
- Стойността на pH трябва да е $5,5 \pm 0,2$ (регулира се чрез добавяне на минимално количество разтвор на NaOH или HCl).
- Регулира се с вода до 1 000 ml.
- Ако изходните разтвори са стерилизирани и е използвана подходяща вода, не е необходима допълнителна стерилизация. Ако стерилизацията се извършва с крайната среда, изходен разтвор 8 трябва да се добави след обработка в автоклав (при 121 °C в продължение на 20 минути).

Приготвяне на 10-кратно концентрирана среда на Steinberg (модифицирана) за междинно съхраняване

- Добавят се 20 ml от изходни разтвори 1, 2 и 3 (вж. таблица 2) към около 900 ml дейонизирана вода, за да се избегне утаяването.
- Добавят се 1,0 ml от изходни разтвори 4, 5, 6, 7 и 8 (вж. таблица 3). Регулирайте с вода до 100 ml.
- Ако изходните разтвори са стерилизирани и е използвана подходяща вода, не е необходима допълнителна стерилизация. Ако стерилизацията се извършва с крайната среда, изходен разтвор 8 трябва да се добави след обработка в автоклав (при 121 °C в продължение на 20 минути).
- Стойността на pH на средата (крайна концентрация) трябва да е $5,5 \pm 0,2$.

▼M4

В.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 хирономиди, 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 система 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 имагиниралите 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.

▼ **M4****ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ**

7. Ларви на хириноиди 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 хириноидите 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. Полезна 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 ± 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.

▼ **M4****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 cm² 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 информация 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 μm);
- 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 (CaCO₃), за да се коригира рН на крайната смес на седимента до 7,0 ± 0,5. Съдържанието на органичен въглерод в крайната смес следва да бъде 2 % (± 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, органохлорни, органофосфорни 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.

▼ **M4****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 CaCO₃. 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.

Изходни 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. Изходен разтвор на изпитваното вещество, разтворено в дехлорирана 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 приготви 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 планове 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. EC₁₅, EC₅₀) 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_x), 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).

▼ **M4**

19. Ако трябва да се направи оценка на ЕС_x, 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 червеи“ (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.

▼ **M4***Стабилизиране*

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 уравнивяване, 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 пониска 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 онази, 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 хирономиди на повърхността, еднаква с използваната в същинското изпитване, хирономидите 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.

▼ **M4***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. yoshimatu*) 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 „Пастъор“, 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 (± 2 °C). Препоръчаните за *C. tentans* и *C. yoshimatu* температури са съответно 23 °C и 25 °C (± 2 °C). Продължителността на излагане на светлина е 16 часа, а интензитетът на светлината трябва да бъде между 500 и 1 000 lux.

▼ **M4***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. yoshimatsui* 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 контролните 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 на 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 покъсно. Седиментът от тези допълнителни съдове се пресява през сито с размер на отворите 250 µm, 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.

▼ **M4**

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 амонякът 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. Разликите в чувствителността между половете могат да се оценят статистически с помощта напр. на табличния тест χ^2 -т $\times 2$. 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 биномно разпределение (често наричано „екстра биномна“ вариация), прилага се устойчив тест на Cochran-Armitage или точен тест на Fisher, както се предлага в (21).

▼ M4

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 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).
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 ES_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 ES_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:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼ **M4**

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

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{day}_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

където:

day_i : ден на инспекция (дни след прилагането)

l_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,

▼ M4

- 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 стадий 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.

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.

▼ M4

- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D, Day 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 В.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. Statis. 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.

▼ M4*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.

▼ **M4***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.

▼ M4**Имагиниране**

8. При температура от $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 „M4“ и „M7“

12. Среда „M4“ е описана в Elendt (1990). Среда „M7“ се приготвя като „M4“, освен по отношение на указаните в таблица 1 вещества, при които се използват концентрации, четири пъти по-ниски, отколкото използваните в „M4“. Подготвя се публикация за среда „M7“ (Elendt, лично съобщение). Разтворът за изпитване не трябва да се приготвя според Elendt and Bias (1990) тъй като концентрациите на $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 и K_2HPO_4 , посочени за приготвянето на изходния разтвор, не са подходящи.

Приготвяне на среда „M7“

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 „M7“ 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 „M7“ 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. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

▼ **M4**

Таблица 1

Изходни разтвори на микроелементи за среди M4 и M7

Изходни разтвори (I)	Количество (mg), разредено 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)	
		M4	M7	M4	M7
H ₃ BO ₃ (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
MnCl ₂ · 4H ₂ O (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
SrCl ₂ · 6H ₂ O (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
CuCl ₂ · 2H ₂ O (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl ₂ · 6H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ · 7H ₂ O (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Веществата се различават в M4 и M7, 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 M4 и M7

	Количество, разредено до 1 l с дейонизирана вода (mg)	Изходни разтвори на макрохранителни вещества, добавяни за приготвяне на среди M4 и M7 (ml/l)	Крайни концентрации в разтвори за изпитване M4 и M7 (mg/l)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

▼ **M4**

Таблица 3

Изходни разтвори на витамини за среди М4 и М7. 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 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

ElenDt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

ElenDt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼ **M4***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 ≤ 1 mm) и изсушен на въздух	4 – 5
Кварцов пясък	Размер на зърната: > 50 % от частиците следва да бъдат в интервала 50—200 μ m	75 – 76
Каолин	Съдържание на каолинит ≥ 30 %	20
Органичен въглерод	Коригира се чрез добавяне на торф и пясък	2 ($\pm 0,5$)
Калциев карбонат	CaCO ₃ на прах, химически чист	0,05 - 0,1
Вода	Проводимост ≤ 10 μ 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 CaCO₃, 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 CaCO₃. 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.

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.

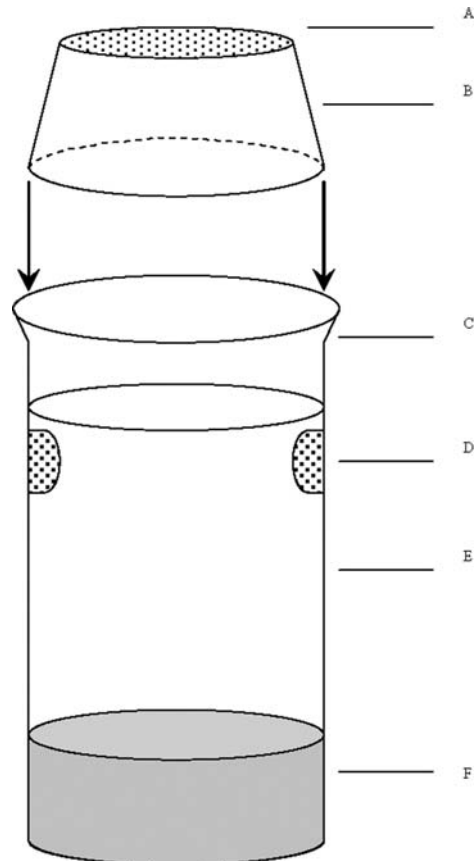
▼ **M4***Допълнение 4***Химични характеристики на приемлива вода за разреждане**

Вещество	Концентрации
Твърди частици	< 20 mg/l
Общ органичен въглерод	< 2 mg/l
Нейонизиран амоняк	< 1 µg/l
Твърдост, изразена като CaCO ₃	< 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“).

▼ **M4***Допълнение 5***Насоки за наблюдение на имагнирането 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: найлонов екран

D: екранирани отвори за смяна на водата

B: обърнати пластмасови панички

E: вода

C: чаша за експозиция без улей

F: седимент

▼ M4

В. 28. ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ЗА ХИРОНОМИДИ В СИСТЕМА ВОДА–СЕДИМЕНТ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА ВОДА С ДОБАВКА

УВОД

1. 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 хирономиди, напр. *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).
2. 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 концентрацииите 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 собствената му фауна; използването на приготвен седимент намалява и разходите във връзка със събирането в полеви условия на достатъчно количество седимент за рутинните изпитвания,

▼ **M4**

- 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 хиროномиди 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 хиროномидите 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 ИЗПИТВАНОТО 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. Полезна 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),
 - 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 наситане 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,

▼ **M4**

- температурата на водата не трябва да варира с повече от ± 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 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 cm² 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. Подробности 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 хириноидите, или да се хранят с тях. Препоръчва се също така, преди използването му в изпитване за токсичност за хириноиди, 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 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 частиците между 50 и 200 μm);
 - 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 (CaCO₃), 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).

▼ **M4**

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 CaCO₃. 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 Stompor RН40, 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 планове 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. ЕС₁₅, ЕС₅₀) 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_x), 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

▼ **M4**

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_{50} , следва да се направи изпитване при най-малко пет концентрации и три повторения за всяка концентрация. Във всички случаи, препоръчва се да се използват достатъчно стойности на концентрациите на изпитване, за да е възможна 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 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 коефициентът 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 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 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 третиранияте 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 слойът 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.

▼ **M4**

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.

▼ M4

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. yoshimatsui*) 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 (± 2 °C). Препоръчаните за *C. tentans* и *C. yoshimatsui* температури са съответно 23 °C и 25 °C (± 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. yoshimatsui* 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.

▼ **M4**

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 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 имагинирали, 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 допълнителните съдове се пресява през сито с размер на отворите 250 µm, 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. Анализирането 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.

▼ **M4***Физични и химични характеристики*

41. рН, 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.

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. Разликите в чувствителността между половете могат да се оценят статистически с помощта напр. на табличния критерий χ^2 -т $\times 2$. 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 р-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 :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼ **M4**

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 ES_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 ES_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:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^m f_i x_i}{n_e}$$

където:

\bar{x} : средна скорост на развитие за съд

i : индекс на периода на инспекция

m : максимален брой периоди на инспекция

▼ **M4**

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:

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,

▼ M4

- 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 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.

▼ **M4**

- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D, Day 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. Statis. 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.

▼ M4*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.

▼ **M4***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 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.

▼ **M4****Имагиниране**

8. При температура от $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 „M4“ и „M7“

12. В Elendt (1990) е описана среда „M4“. Среда „M7“ се приготвя като „M4“, освен по отношение на указаните в таблица 1 вещества, при които се използват концентрации, четири пъти по-ниски, отколкото използваните в „M4“. Подготвя се публикация за среда „M7“ (Elendt, лично съобщение). Разтворът за изпитване не трябва да се приготвя според Elendt and Bias (1990), тъй като концентрациите на $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 и K_2HPO_4 , посочени за приготвянето на изходния разтвор, не са подходящи.

Приготвяне на среда „M7“

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 „M7“ 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 „M7“ 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 M4 и M7

Изходни разтвори (I)	Количество (mg), разредено до 1 l с дейонизирана вода	За приготвянето на комбинирания 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)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_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
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼ **M4**

Изходни разтвори (I)	Количество (mg), разредено до 1 l с дейониизирана вода	За приготвянето на комбинирания изходен разтвор (II): смесват се следните количества (ml) от всеки от изходните разтвори (I) и се долива до 1 литър дейониизирана вода		Крайна концентрация в разтворите за изпитване (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl ⁽¹⁾	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
SrCl ₂ · 6H ₂ O ⁽¹⁾	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ⁽¹⁾	320	1,0	0,25	0,016	0,004
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O ⁽¹⁾	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
CuCl ₂ · 2H ₂ O ⁽¹⁾	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl ₂ · 6H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ · 7H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

⁽¹⁾ Тези вещества се различават в M4 и M7, както е посочено по-долу.

⁽²⁾ Разтворите се приготвят отделно, изливат се заедно и незабавно се автоклавираат.

Таблица 2

Изходни разтвори на макрохранителни вещества за среди M4 и M7

	Количество, разредено до 1 l с дейониизирана вода (mg)	Изходни разтвори на макро- хранителни вещества, добавяни за приготвяне на среди M4 и M7 (mg/l)	Крайни концен- трации в разтвори за изпитване M4 и M7 (mg/l)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

▼ **M4**

Таблица 3

Изходни разтвори на витамини за среди М4 и М7

Събират се всички три разтвора на витамини, за да се приготви един общ изходен разтвор на витамини

	Количество, разредено до 1 l с деионизирана вода (mg)	Количество разтвор на витамини, добавяно за приготвяне на среди М4 и М7 (mg/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

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.

ElenDt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

ElenDt 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.

▼ **M4***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 ≤ 1 mm) и изсушен на въздух	4–5
Кварцов пясък	Размер на зърната: > 50 % от частиците следва да бъдат в интервала 50—200 μm	75–76
Каолин	Съдържание на каолинит ≥ 30 %	20
Органичен въглерод	Коригира се чрез добавяне на торф и пясък	2 ($\pm 0,5$)
Калциев карбонат	CaCO ₃ на прах, химически чист	0,05 - 0,1
Вода	Проводимост ≤ 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 CaCO₃, 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 CaCO₃. 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.

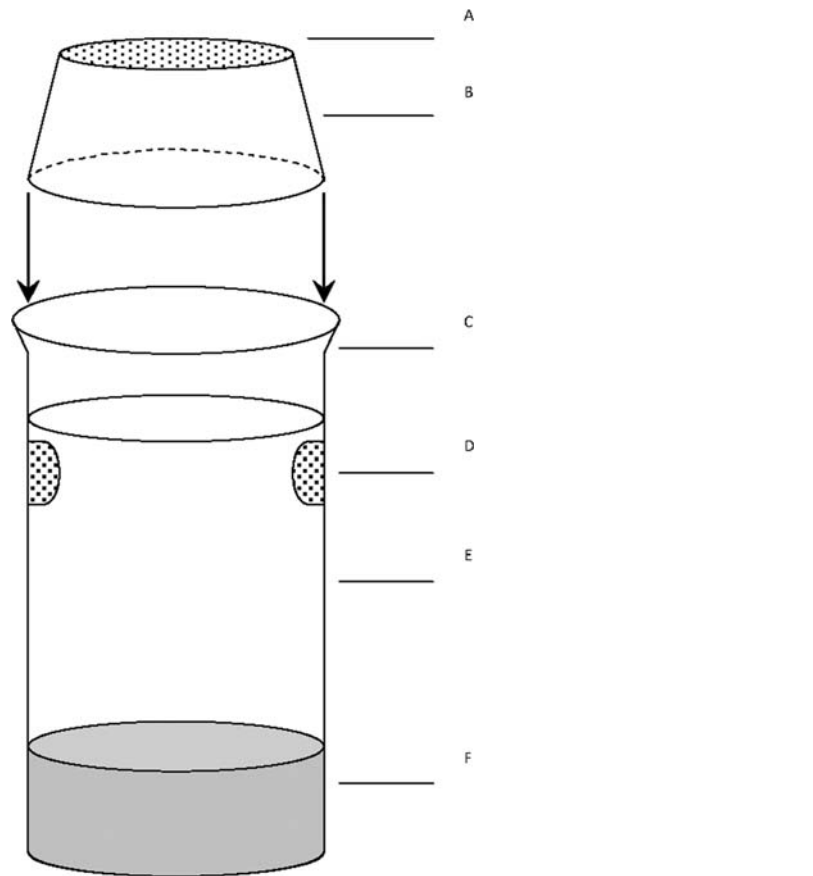
▼ **M4***Допълнение 4***Химични характеристики на приемлива вода за разреждане**

Вещество	Концентрации
Твърди частици	< 20 mg/l
Общ органичен въглерод	< 2 mg/l
Нейонизиран амоняк	< 1 µg/l
Твърдост, изразена като CaCO ₃	< 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“).

▼ **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 | D: екранирани отвори за смяна на водата |
| B: обърнати пластмасови панички | E: вода |
| C: чаша за експозиция без улей | F: седимент |

▼ **M4****В.29. ЛЕСНА БИОРАЗГРАДИМОСТ — CO₂ В ЗАПЕЧАТАНИ СЪДОВЕ (ИЗПИТВАНЕ В СВОБОДНОТО ПРОСТРАНСТВО НАД ТЕЧНОСТТА)**

УВОД

1. Настоящият метод е еквивалентен на Насоките за изпитване (НИ) на ОИСР 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) CO₂ се отделя от течната фаза в абсорбиращи съдове чрез барботиране (т.е., пропускане на мехурчета въздух през течната фаза за отделяне на CO₂), а във версията на Larson (3)(4) CO₂ се пренася от реакционния съд към абсорбери с помощта на въздух, несъдържащ CO₂, 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 CO₂ се събира във вътрешен алкален уловител директно от газовата фаза, както в класически респирометър на Warburg/Barcroft.
3. 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, достигащи до 8 mg/l. Поради това, събирането на CO₂ в алкалните уловители не отразява вярно количеството CO₂, произвеждано от микроорганизмите в различни междинни моменти по време на разграждането. В резултат на това изискването, според което > 60 % от теоретично максималната продукция на CO₂ (ThCO₂) 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).
4. 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.

▼ M4

5. Други недостатъци на метода на Sturm (обременителен, изискващ много време, по-податлив на лабораторни грешки и неприложим за летливи химикали) дадоха гласък на търсене на техника с херметично затворен съд, различна от тази на Gledhill, а не такава с преминаващ газ (10)(11). Voatman et al (12) преразгледаха по-ранните методи и възприеха затворена система със свободно пространство, в която CO₂ се освобождава в свободното пространство след инкубация с помощта на ацидификация на средата. CO₂ се измерваше с газово-хроматографски (ГХ) анализ (газова хроматография/йонна 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 необходимост много малки количества неразтворими изпитвани химикали, и/или поради възможността в инокулираната среда да няма достатъчно (или изобщо) микроорганизми, способни да разграждат изпитвания химикал.
6. Посочените трудности бяха преодолени 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) CO₂ се измерва в свободното пространство след ацидификация и уравновесяване, 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 CO₂.
7. Двата подхода са обединени в стандарта на ISO (изпитване на CO₂ 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 CO₂, а именно измерване на CO₂ 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 извършваното 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 B.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 ОИСП кръгово изпитване (21) на преразгледаните методи за изпитване.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

8. 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 CO₂, 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 (ThIC), въз основа на количеството на добавения в началото изпитван химикал (изразен като органичен въглерод).
9. Мога да се измерят също и елиминирането на DOC и/или степента на първично биоразграждане на изпитвания химикал (20).

▼ **M4**

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 ThC 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.

▼ M4

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
Хексадецилтри-метил (*) Амониев хлорид (катионен)	75	13	10
Изононилфенол (етоксилат) ₉ (нейонен)	41	32	10
Кокоамидпропил диметилхидрокси сулфобетайн (амфотерен)	60	23	11

(*) Беше добавен SiO₂ 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, неубедителни 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:
- 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 ± 1 ml). Може да се използва стъкло с по-малък размер, ако резултатите удовлетворяват условията, описани в точки 66 и 67;
 - анализатор за въглерод или друг инструмент (напр. газов хроматограф) за измерване на неорганичния въглерод;

▼ **M4**

- в) високочинни спринцовки за пробите от газове и течности;
- г) орбитална клатачна машина в среда с контролирана температура;
- д) източник на въздух без CO₂ — такъв въздух може да се приготви чрез пропускане на въздух през гранули натронкалк, или се използва газова смес от 80 % N₂/20 % O₂ (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 ≤ 1 mg/l общ органичен въглерод. Това представлява ≤ 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 (KH₂PO₄) 8,50 g

Дикалиев хидрогенфосфат, (K₂HPO₄) 21,75 g

Динариев хидрогенфосфат дихидрат (Na₂HPO₄·2H₂O) 33,40 g

Амониев хлорид, (NH₄Cl) 0,50 g

Съставките се разтварят във вода и се долива вода до 1 литър. Стойността на pH на разтвора следва да бъде 7,4 (± 0,2). Ако това условие не е изпълнено, се приготвя нов разтвор.

- б) Калциев хлорид дихидрат (CaCl₂·2H₂O) 36,40 g

Разтваря се във вода и се долива вода до 1 литър.

- в) Магнезиев сулфат хептахидрат (MgSO₄·7H₂O) 22,50 g

Разтваря се във вода и се долива вода до 1 литър.

- г) Железен(III) хлорид хексахидрат (FeCl₃·6H₂O) 0,25 g

Съставките се разтварят във вода, долива се вода до 1 литър и се добавя една капка концентрирана 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 (H₃PO₄) (> 85 % маса на обем).

▼ **M4***Разтвор на натриев хидроксид 7M*

21. 280 g натриев хидроксид (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 pH 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).

▼ **M4***Инокулум*

25. Инокулумът може да произхожда от различни източници: активна утайка; изходящи 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, изходящите 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 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 mm²), 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 супернатантът 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.

▼ **M4**

32. Възможно е да се намали още повече отделянето на CO_2 в контролните съдове без изпитван химикал чрез аериране на утайката в продължение на една нощ, като се използва несъдържащ CO_2 въздух. Използваната 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 филтруват 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_2 (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 филтрувани 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_2 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_2 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.

▼ **M4***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 HgCl₂ 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 изпитвания 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.

▼ **M4**

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/min), 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, F₁ 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 CO₂ 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 CO₂ в карбонат, да бъде прясно 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 pH < 3

52. Преди всяка група анализи, анализаторът на IC се калибрира с подходящ стандарт за IC (напр. 1 % т/т CO₂ в N₂). През запушалката във всяко стъкло се инжектира концентрирана ортофосфорна киселина (вж. точка 20), за да се намали 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 mg C/l.

▼ **M4**

53. Методът се основава на принципа, че след ацидификация до $\text{pH} < 3$ и уравнивяване при $20\text{ }^\circ\text{C}$, равновесната константа на разпределението на 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 mg/l IC, като се използва разтвор от безводен натриев карбонат (Na_2CO_3) в несъдържаща CO_2 вода, приготвена чрез ацидификация на вода до pH 6,5 с концентрирана ортофосфорна киселина (точка 20), барботирана една нощ с несъдържащ CO_2 въздух и повишаване на 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 филтруват 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 CO_2 в карбонат

55. Преди всяка група анализи, анализаторът на IC се калибрира с подходящ стандарт за IC – например разтвор на натриев бикарбонат (NaHCO_3) във вода, несъдържаща CO_2 (вж. точка 53), в обхвата 0—20 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 не 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 μl) 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 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 филтруват 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.

▼ **M4****ДАНИИ И ОТЧИТАНЕ****Изчисляване на резултатите**

58. Ако се предположи, че изпитваният химикал е минерализиран 100 % до CO₂, 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 (ТІС) във всяко стъкло е:

$$\begin{aligned} \text{ТІС} &= (\text{mg C в течността} + \text{mg C в свободното пространство}) \quad \text{Уравнение [1]} \\ &= (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \end{aligned}$$

където:

V_L = обем на течността в стъклото (литри);

C_L = концентрация на ІС в течността (като въглерод в mg/l);

V_H = обем на свободното пространство (литри);

C_H = концентрация на ІС в свободното пространство (като въглерод в mg/l).

Изчисляването на ТІС 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:

$$\%D = \frac{(\text{ТІС}_t - \text{ТІС}_b)}{\text{ТОС}} \times 100 \quad \text{Уравнение [2]}$$

където:

ТІС_t = mg ТІС в стъклото за изпитване в момент t;

ТІС_b = средно mg ТІС 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 уравниването 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] $\text{ТІС} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, където V_B = обем на стъклото за серум.

Превръщане на CO₂ 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 $\text{ТІС} = V_L \times C_L$.

▼ **M4****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 задържа на едно ниво. Ако са получени съпоставими резултати за съдовете F_T 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_C , и, ако са включени F_S и F_I — 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_B) се записват, както и онези в съдовете F_S (проверка за абиотично разграждане), ако тези съдове са включени в изпитването.
65. Изчислява се D за съдовете F_I 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_{FI} , 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_S (абиотично разграждане) се наблюдава значително ($> 10\%$) повишаване на количеството на общия неорганичен въглерод, може да е протекъл процес на абиотично разграждане.

Валидност на резултатите▼ **M7**

66. Изпитването се смята за валидно, ако:
- средният процент на разграждане в съдовете F_C , съдържащи референтния химикал, е $> 60\%$ към 14-я ден на инкубацията; както и
 - средното количество на общия неорганичен въглерод в празните контроли F_B в края на изпитването е $< 3\text{mg C/l}$.

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 високият добив на неорганичен въглерод в празните проби е проблем, трябва да се следва процедурата, посочена в точки 27—32.

(¹) Процент на биоразграждане в съдовете F_C , съдържащи референтното вещество.

(²) Процентът на разграждане в съдове F_I .

▼ **M4**

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 рН 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.

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 надолу 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 дозирания 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,

▼ M4

- 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 CO₂ (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.

▼ M4

- (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 (CO₂ headspace test).
- (17) Battersby NS (1997). The ISO headspace CO₂ 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 CO₂ 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.

▼ **M4***Допълнение 1***СЪКРАЩЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

IC: Неорганичен въглерод

ThCO₂: 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⁻²) 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 CO₂ и H₂O при аеробни условия, и до CH₄, CO₂ и H₂O при анаеробни условия.

Латентна фаза: Периодът от началото на изпитването до момента на достигане на аклиматизиране и/или адаптация на разлагачите 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.

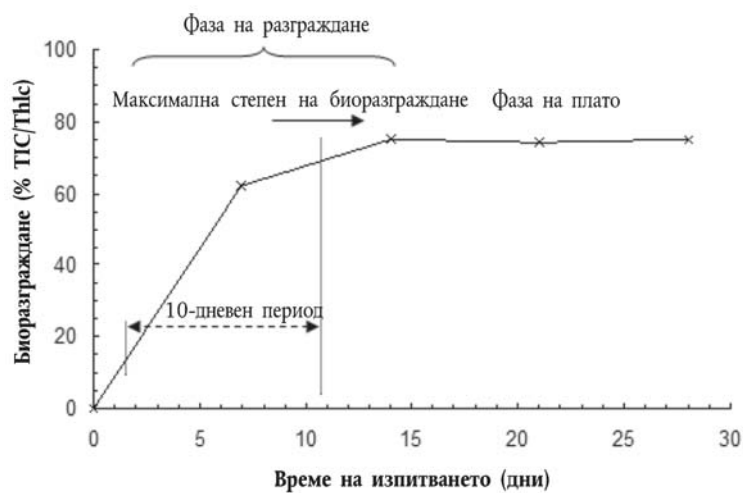
▼ M4

Допълнение 2

Пример на крива на биоразграждане

Фигура 1

Биоразграждане на 1-октанол в изпитване за CO₂ в свободно пространство



Терминологичен справочник

Биоразграждане:

Фаза на разграждане:

Максимална степен на биоразграждане:

Фаза на плато:

10-дневен период:

Време на изпитването (дни)

▼ **M4****V.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. Хранещите 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 ОИСП 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),

▼ **M4**

- 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 изходен 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 точно сцинтилационно 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_x) или леталната концентрация (LC_x) за времето на фазата на поглъщане (напр. (19)). Избраната концентрация на изпитвания химикал следва да бъде около 1% от острата асимптотична LC₅₀ 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)).

▼ M4

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 ^{14}C , трябва да се познава специфичната радиоактивност (т.е., Bq mol^{-1}) 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_s) и константата на скоростта на елиминиране (k_e). 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 аналитични 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_k , 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

▼ **M4**

в стационарно състояние (BCFss) да се изчислява както като съотношение между концентрацията в червеите (Ca) и концентрацията в почвата (Cs) при видимо стационарно състояние, така и като кинетичен коефициент на биоаккумуляция BAFK, т.е., като съотношение между константата на скоростта на поглъщане от почвата (ks) и константата на скоростта на елиминиране (ke) (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 (BAFK), 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 червей, 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.

▼ M4**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 силинизирани 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). Полезна 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 на киснат 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,

▼ **M4**

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 подпомагаш 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 хапанче 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, която 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.

▼ M4

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 нетретирани 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 третирани) 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

▼ M4

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 ± 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 обосновават. Ако токсичността на изпитвания химикал (ЕСх) 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 фоновите 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 подпомагащ разтварянето 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.

▼ M4

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 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$).
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.

▼ M4

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 (≤ -18 °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 концентрации, които са по-високи от фона. Когато концентрацията на изпитвания химикал в опитния организъм S_a е > 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 анализираната 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 отчитат.
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.

▼ **M4****ДАНИ И ОТЧИТАНЕ****Обработка на резултатите**

54. Кривата на поглъщането на изпитвания химикал се получава чрез начертаване 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_{ss} 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_{ss} се изчислява BAF_K, както е описано по-долу:

— Определя се коефициентът на акумулация (BAF_K) като съотношението k_s/k_e .

— Скоростите на поглъщане и елиминирание се изчисляват за предпочитане едновременно (вж. уравнение 11 в допълнение 2).

— Константата на скоростта на елиминирание (k_e) обикновено се определя чрез кривата на елиминирание (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_K 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. EC₅₀, LC₅₀, 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.

▼ **M4***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 (рН, 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 тегло и влажното тегло на почвата и изпитваните организми (полезно за нормализацията),
- влажното тегло на червеите по всяко време на вземане на проби; по отношение на земните червеи, влажното тегло 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 определяно),
- 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 $kg\ почва \cdot kg^{-1}$ червеи), скорост на поглъщане в почвата (изразена в $g\ почва \cdot kg^{-1}$ червеи $ден^{-1}$), и константа на скоростта на елиминиране (изразена в $ден^{-1}$); BSAF (изразен в $kg\ почва\ OC\ kg^{-1}$ липидно съдържание на червеите) може да се отчете допълнително,

▼ **M4**

- 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 (γ -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. Pysiol. 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.

▼ **M4**

- (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 Oligochaetes*, 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-Hexachlorocyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼ M4

- (29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.
- (30) Gabric A.J, Connell 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 ¹⁴C-Hexachlorbenzol und ¹⁴C-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.

▼ M4

- (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 Oligochaetes, 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, Luttk 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, Efrogmson 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 (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). *Carolinea* 57: 93-100.

▼ **M4**

- (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.

▼ **M4***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_{SS}) 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_k).

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 в/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.

▼ M4

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} червей 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.

▼ **M4***Допълнение 2***Изчисляване на параметрите на поглъщане и елиминирание**

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 BAFss. 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 елиминирание (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 [$g\ kg^{-1}$ влажно или сухо тегло]

k_s = константа на скоростта на поглъщане в тъкани [$g\ почва\ kg^{-1}\ червеи\ ден^{-1}$]

C_s = концентрация на химикала в почва [$g\ kg^{-1}$ влажно или сухо тегло]

k_e = константата на скоростта на елиминирание [$дни^{-1}$]

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):

$$C_s = C_0 (e^{-k_0 t}) \quad [\text{уравнение 5}]$$

▼ M4

където

C_s = концентрация на химикала в почвата [g 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 kg^{-1} влажно или сухо тегло]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k e^t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{уравнение 6}]$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t c} * e^{-k(t-t_c)} \quad t > t_c \quad [\text{уравнение 7}]$$

където

C_a = концентрация на химикала в червеи [g kg^{-1} влажно или сухо тегло]

k_s = константа на скоростта на поглъщане в тъкани [g почва kg^{-1} червеи дни^{-1}]

k_0 = константата на скоростта на разграждане [дни^{-1}]

k_e = константата на скоростта на елиминиране [дни^{-1}]

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 описване на развитието на елиминирането във времето може да се използва еднокамерен модел (уравнение 9):

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k e^t} \quad (\text{уравнение 10})$$

▼ **M4**

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)).

▼ **M4***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.

▼ M4

Ден	Дейност
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 уравниряване) 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 разпределяне 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.

▼ **M4**

Ден	Дейност
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 енхитриди

- 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; уравнисяване при условията на изпитването в продължение на 4 дни (3 седмици при почва с добавен метал).
– 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 разпределяне 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.

▼ M4

Ден	Дейност
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 уравновесяване) 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).

▼ **M4**

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 микрозамърсители, 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 ₃ 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 желания интервал (6,0 ± 0,5), в почвата се добавя достатъчно количество CaCO₃, 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).

▼ M4**Съхранение**

Сухите съставки на изкуствената почва може да се съхраняват при стайна температура докато не бъдат използвани. Приготвената, 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.

▼ **M4***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 ОИСР (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 подбрана 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. Landwirtschaft. 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.

▼ M4

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. Жизненият 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 luxuriosus*. 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 luxuriosus*. 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 поддава на отглеждане и изпитване (напр. Kuregman 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.

▼ **M4**

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 оставащата 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. *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) или хищни акари (напр. *Hypoaspis (cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina). След дезинфекция, храната се смела, 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 изявен белезникав цвят, и ако се наблюдават червеи от различни възрасти. Червеите могат да се считат за здрави, ако се възпроизвеждат непрекъснато.

Допълнителна подбрана 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.

▼ **M6****V.31. ИЗПИТВАНЕ НА СУХОЗЕМНИ РАСТЕНИЯ: ИЗПИТВАНЕ ЗА ПОНИКВАНЕ И РАСТЕЖ НА ПОНИЦИ**

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 208 (2006). Методите за изпитване периодично се преразглеждат с оглед на научния прогрес и приложимостта за регулаторно използване. Настоящият актуализиран метод за изпитване е предназначен за оценка на потенциалните въздействия на химикалите върху поникването и растежа на пониси. Като такъв той не обхваща хроничните въздействия или въздействията върху размножаването (напр. завръз, образуване на цветове, зреене на плода). Условиата на експозиция и свойствата на химикала за изпитване трябва да се вземат под внимание по такъв начин, че да се гарантира, че се използват подходящи методи за изпитване (например при изпитване на метали/метални съединения трябва да се вземе под внимание въздействието на рН и свързаните с него противоположно натоварени йони) (1). Настоящият метод за изпитване не се отнася до растения, изложени на изпарения на химикали. Този метод на изпитване е приложим за проверката на общи химикали, биоциди и продукти за растителна защита (известни също като пестициди). Той е разработен въз основа на съществуващите методи (2) (3) (4) (5) (6) (7). Взети са предвид и други позовавания, отнасящи се до изпитвания на растения (8) (9) (10). Определенията, които са използвани, са дадени в допълнение 1.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

2. С изпитването се оценява въздействието върху поникването и началото на растежа на пониси при висши растения след експозиция на изпитвания химикал в почвата (или друга подходяща почвена матрица). Семената се поставят в контакт с почва, третирана с изпитвания химикал и се прави оценка на въздействията, появяващи се обикновено от 14 до 21 дни след 50 % поникване на понисите в контролната група. Измерените крайни точки са визуална оценка на поникването на понисите, сухо тегло на поника (като алтернатива, свежо тегло на поника) и, в определени случаи, височина на поника, както и оценка на видимите неблагоприятни въздействия върху различни части на растението. Посочените измервания и наблюдения се сравняват с тези при нетретирани контролни растения.
3. В зависимост от очаквания път на експозиция, изпитваният химикал или се внася в почвата (или евентуално в изкуствена почвена матрица), или се прилага към почвената повърхност, което представя по подходящ начин потенциалния път за експозиция на химикала. Внасянето в почвата се извършва чрез третиране на почвата в насипно състояние. След прилагането почвата се прехвърля в саксии и след това семената от дадения растителен вид се засаждаат в почвата. Прилагането към почвената повърхност се извършва върху почва, която вече е била поставена в саксии и в която семената вече са били засадени. След това изпитваните обекти (контроли и третирани почви плюс семена) се поставят при подходящи условия за подпомагане на покълването/растежа на растенията.
4. Изпитването може да се проведе за определяне на кривата доза-отклик, или при единична концентрация/доза като гранично изпитване в зависимост от целта на изследването. Ако резултатите от изпитването на единична концентрация/доза надвишават определено равнище на токсичност (например когато се наблюдават въздействия, по-големи от x %), се извършва изпитване за определяне на обхвата, за да се определят горни и долни граници за токсичност, последвано от изпитване с множество концентрации/доза, за да се генерира крива доза-отклик. Използва се подходящ статистически анализ за получаване на ефективна концентрация EC_x или ефективна доза на прилагане ER_x (например EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) за най-чувствителния(те) параметър(ри), които представляват интерес. Също така, при това изпитване могат да бъдат изчислени концентрацията без наблюдавано въздействие (NOEC) и най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC).

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНИЯ ХИМИКАЛ

5. Следната информация е полезна за идентифициране на очаквания път на експозиция на химикала и за планирането на изпитването: структурната формула, чистотата, разтворимостта във вода, разтворимостта в

▼ **M6**

органични разтворители, коефициентът на разпределение 1-октанол/вода, поведението при сорбция в почвата, парното налягане, стабилността на химикала във вода и на светлина, и биоразградимостта.

ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

6. За да бъде считано за валидно изпитването, за контролите следва да се изпълнят следните критерии:
- поникването е най-малко 70 %;
 - поничите не проявяват видими признаци на фитотоксично въздействие (напр. хлороза, некроза, увяхване, деформации на листата и стъблото) и растенията показват само нормалното вариране по отношение на растежа и морфологията за този конкретен растителен вид;
 - средната стойност на преживелите поникнали поничи в контролите е поне 90 % за периода на проучването;
 - условията на околната среда за конкретния растителен вид са идентични и средата на растеж съдържа еднакво количество от почвената матрица, поддържащата среда, или субстрата от един и същ източник.

РЕФЕРЕНТЕН ХИМИКАЛ

7. Референтният химикал може да бъде изпитван на редовни интервали от време, за да се провери дали провеждането на изпитването, откликът при конкретните изпитвани растения и условията на изпитването не са се променили значително с течение на времето. Като алтернатива, данните за минали периоди за биомасата или за измервания на растежа в контролите могат да бъдат използвани за оценка на параметрите на системата за изпитване в конкретни лаборатории, и могат да послужат като вътрешнолабораторна мярка за контрол на качеството.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**Естествена почва — изкуствен субстрат**

8. Растенията могат да се отглеждат в саксии, с използване на праховито-песъклива, песъклива (свързан пясък) или глинесто-песъклива почва, която съдържа до 1,5 процента органичен въглерод (около 3 процента органична материя). Могат да се използват също почви за саксийни растения или синтетични почвени смеси, които са на разположение в търговската мрежа и които съдържат до 1,5 процента органичен въглерод. Глинести почви не бива да се използват, ако за изпитвания химикал е известно, че е с висок афинитет към глина. Естествената почва следва да се пресее до частици с размер 2 mm, за да се хомогенизира и да се отстранят едрите частици. Типът и текстурата, %-ното съдържание на органичен въглерод, pH и съдържанието на соли, както и електропроводимостта на окончателната приготвена почва следва да бъдат протоколирани. Почвата следва да бъде класифицирана съгласно стандартна схема за класификация (11). Почвата може да бъде пастьоризирана или термично обработена, за да се намали въздействието на почвените патогени.
9. Естествената почва може да усложни тълкуването на резултатите и да повиши варирането поради различни физични/химични свойства и микробни популации. Тези променливи на свой ред променят капацитета за задържане на влага, капацитета за свързване на химикала, аерирането и съдържанието на хранителни вещества и микроелементи. В допълнение към варирането на тези физически фактори ще има и различия по отношение на химическите свойства, като например pH и редокси потенциала, което може да повлияе на бионаличността на изпитвания химикал (12) (13) (14).
10. Обикновено не се използват изкуствени субстрати за изпитване на препарати за растителна защита, но те могат да бъдат от полза за изпитване на общи химикали или когато е необходимо свеждане до минимум на варирането в естествените почви и увеличаване на съпоставимостта на резултатите от изпитването. Използваните субстрати следва да се състоят от инертни материали, които намаляват до минимум взаимодействието с изпитвания химикал, с разтворителя, използван като носител, или и с двете. За кварцовия пясък, промит с киселина, минералната вата и стъклените перли (напр. от 0.35 до

▼ **M6**

0,85 mm в диаметър) е установено, че са подходящи инертни материали, които абсорбират изпитвания химикал в минимална степен (15), като се гарантира, че химикалът ще е максимално достъпен за усвояване от поничите чрез корените. Неподходящи субстрати включват вермикулит, перлит и други силно абсорбиращи материали. Следва да се предоставят хранителни вещества за растежа на растенията, за да се гарантира, че растенията не са подложени на стрес от недостатъчно хранителни вещества, и когато е възможно, това следва да бъде оценено чрез химичен анализ или чрез визуална оценка на растенията в контролите.

Критерии за подбор на изпитваните растителни видове

11. Изборът на растителни видове следва да бъде в разумно широки граници, напр. като се има предвид тяхното таксономично разнообразие в растителното царство, тяхното разпределение, изобилие, специфични за различните видове характеристики на жизнения цикъл и района на естествено срещане, с оглед получаване на диапазон от отклици (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). При подбор следва да бъдат взети предвид следните характеристики на евентуалните видове за изпитването:

- видовете имат еднакви семена, които са леснодостъпни от надежден(ни) източник(ци) на посевен материал и които са с последователна, надеждна и равномерна кълняемост, както и еднакъв растеж на поничите;
- растението може да бъде предмет на изпитвания в лабораторни условия, и може да дава надеждни и възпроизводими резултати във или извън рамките на изпитвателните съоръжения;
- чувствителността на изпитваните видове следва да съответства на отклиците на растения в околната среда, експонирана на химикала;
- те са били използвани до известна степен в предходни изпитвания за токсичност и тяхното използване, например при биологични изследвания на хербициди, скрининг на тежки метали, тестове за устойчивост към соленост или минерализация или проучвания за алелопатия, показва чувствителност спрямо голямо разнообразие от стресови фактори;
- те са съвместими с условията на растеж на метода за изпитване;
- те отговарят на критериите за валидност на изпитването.

Някои от най-често използваните изпитвани видове през предходни периоди са включени в допълнение 2, а потенциални неземеделските видове — в допълнение 3.

12. Броят на видовете за изпитване зависи от съответните регулаторни изисквания, поради това не е посочен в настоящия метод за изпитване.

Прилагане на изпитвания химикал

13. Химикалът трябва да бъде приложен в подходящ носител (напр. вода, ацетон, етанол, полиетиленгликол, арабска гума, пясък). Смеси (формулирани продукти или формулировки), които съдържат активни съставки и различни адюванти също могат да бъдат изпитвани.

Внасяне в почва/изкуствен субстрат

14. Химикали, които са разтворими във вода или суспендират във вода, могат да бъдат добавени към вода, след което разтворът се смесва с почвата с подходящо смесително устройство. Този тип изпитване може да бъде подходящ, ако експозицията на химикала е чрез почвата или чрез водата между почвените частици, и усвояването чрез корените е източник на загриженост. Капацитетът на почвата за задържане на вода не трябва да бъде надхвърлян чрез добавянето на изпитвания химикал. Обемът на добавената вода трябва да е еднакъв за всяка изпитвана концентрация, но следва да бъде ограничен, за да се предотврати слепване на почвени агломерати.

▼ M6

15. Химикали с ниска водоразтворимост трябва да се разтворят в подходящ летлив разтворител (напр. ацетон, етанол) и да се смесят с пясък. След това разтворителят може да бъде отстранен от пясъка, с използване на струя въздух при непрекъснато разбъркване на пясъка. Третираният пясък се смесва с опитната почва. Установява се втора контрола, която получава само пясък и разтворител. Равни количества пясък, смесен с разтворител, който след това е отстранен, се добавят към всички равнища на третиране и към втората контрола. За твърди, неразтворими изпитвани химикали, суха почва и химикалът се смесват в подходящо смесително устройство. След това почвата се добавя към саксиите и семената са засяват веднага.
16. Когато вместо почва се използва изкуствен субстрат, химикалите, които са разтворими във вода, могат да бъдат разтворени в хранителния разтвор непосредствено преди началото на изпитването. Химикали, които са неразтворими във вода, но които могат да бъдат суспендирани във вода с използвани като носител разтворители, следва да бъдат добавени с носителя към хранителния разтвор. Неразтворимите във вода химикали, за които няма нетоксичен водоразтворим носител, следва да се разтворят в подходящ летлив разтворител. Разтворът се разбърква с пясък или стъклени перли, поставя се в ротационен вакуумен изпарител, и се изпарява, в резултат на което равномерен слой от химикала остава върху пясъка или перлите. Претеглена част от перлите трябва да се подложи на екстракция със същия органичен разтворител и химикалът се анализира преди поставянето в саксиите.

Прилагане към почвената повърхност

17. При продуктите за растителна защита разпръскването по повърхността на почвата на изпитвания разтвор се използва често за прилагане на изпитвания химикал. Всяко оборудване, използвано при провеждане на изпитванията, включително оборудване, което се използва за подготовка и прилагане на изпитвания химикал, следва да бъде с такъв дизайн и капацитет, че изпитванията с това оборудване да могат да се провеждат с точност и то да дава възпроизводимо покритие. Покритието следва да е еднакво по цялата почвена повърхност. Следва да се положат грижи за избягване на възможността химикалите да бъдат адсорбирани в оборудването или да реагират с него (напр. пластмасови епруветки и липофилни химикали, или стоманени части и елементи). Изпитваният химикал се разпръсква върху повърхността на почвата, като се симулира типично прилагане с устройство за разпръскване. Като цяло, разпръскваните обеми следва да съответстват на обичайната земеделска практика и обеми (количеството вода и т.н., следва да бъдат протоколирани). Типът на дюзите трябва да е избран така, че да се осигурява еднакво покритие на повърхността на почвата. Ако се прилагат разтворители и носители, следва да бъде създадена втора група от контролни растения, които да получат само разтворител/носител. Това не е необходимо за продукти за растителна защита, изпитвани като формулировки.

Проверка на концентрацията/дозата на изпитвания химикал

18. Концентрациите/дозите трябва да бъдат потвърдени с подходяща аналитична проверка. За разтворими химикали проверката на всички изпитвани концентрации/дозы може да бъде потвърдена чрез анализ на изпитвания разтвор с най-високата концентрация, използван за изпитването, с документиране относно последващото разреждане и използването на калибрирано оборудване за прилагането (напр. калибрирана лабораторна стъклария, калибриране на оборудването за пръскане). За неразтворимите химикали трябва да се направи проверка на съставния материал с теглата на изпитвания химикал, добавен към почвата. Ако се изисква доказване на хомогенност, може да бъде необходим анализ на почвата.

ПРОЦЕДУРА

ПЛАНИРАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

19. Семена от един и същ вид се засаждат в саксии. Броят на засадените във всяка саксия семена зависи от растителния вид, размера на саксията и продължителността на изпитването. Чрез броя на засадените във всяка саксия растения следва да се предоставят подходящи условия

▼ **M6**

за растеж и да се избягва прекомерно струпване по време на изпитването. Максималната плътност на растенията следва да е 3—10 семена на 100 cm² в зависимост от големината на семената. Като пример се препоръчват от едно до две растения царевица, соя, домати, краставици или захарно цвекло за контейнер с размер 15 cm; три растения рапица или грах за контейнер с размер 15 cm; и 5—10 растения лук, пшеница или други малки семена за контейнер с размер 15 cm. Броят на семената и на саксиите за повторения (повторението се определя като саксия и следователно растенията в рамките на една и съща саксия не представляват повторение) следва да бъде достатъчен за оптимален статистически анализ (21). Следва да се отбележи, че варирането ще бъде по-голямо при изпитването на растителни видове, при които на саксия (повторение) се използват по-малко на брой големи по размер семена, в сравнение с изпитвани растителни видове, при които на саксия могат да се използват повече на брой малки по размер семена. Чрез засаждане на равен брой семена във всяка саксия това вариране може да бъде сведено до минимум.

20. Контролните групи се използват, за да се гарантира, че наблюдаваните въздействия са свързани с експозиция на изпитвания химикал, или са резултат само от такава. Подходящата контролна група трябва да е еднаква във всяко едно отношение с изпитваната група, с изключение на експозицията на изпитвания химикал. В рамките на дадено изпитване всички изпитвани растения, включително контролите, трябва да са от един и същ източник. Изисква се случайно определяне на изпитваните и контролните саксии, с цел да се предотврати изместването.
21. Семената, покрити с инсектицид, фунгицид (т.е. „обработени“ семена), следва да бъдат избягвани. Независимо от това използването на някои несистемни фунгициди с контактно действие (например каптан, тирам) е разрешено от някои регулаторни органи (22). Ако семепреносимите патогени са повод за загриженост, семената може да се напият за кратко в слаб 5 % разтвор на хипохлорит, след това да се изплакнат многократно в течаща вода и да се изсушат. Не се разрешава лечебно третиране с други продукти за растителна защита.

Условия на изпитването

22. Условията на изпитването следва да се доближават до условията, необходими за нормалния растеж на изпитваните видове и сортове (в допълнение 4 се съдържат примери за условия на изпитването). Нововъзникващите растения следва да се съхраняват с използването на добри градинарски практики в климатични камери, вегетационни къщи или оранжерии. Когато се използват съоръжения за регулиране на растежа, тези практики обикновено включват контрол и достатъчно често (например ежедневно) записване на температурата, влажността, концентрацията на въглероден диоксид, осветлението (интензитет, дължина на вълната, фотосинтетично активно излъчване) и времетраенето му, средства за напояване и др., за осигуряване на добро развитие на растенията, в сравнение с контролните растения от избрания растителен вид. Температурите в оранжерии трябва да се контролират чрез вентилиране, отоплителни и/или охладителни системи. За изпитване в оранжерии обикновено се препоръчват следните условия:

— температура: 22 °C ± 10 °C;

— влажност: 70 % ± 25 %;

— времетраене на осветлението: минимум 16 часа светлина;

— светлинен интензитет: 350 ± 50 μE/m²/s. Може да е необходимо допълнително осветление, ако интензитетът намалее под 200 μE/m²/s при дължина на вълната 400—700 nm, с изключение на някои растителни видове, при които изискванията към осветлението са по-ниски.

Условията на околната среда следва да бъдат наблюдавани и протоколирани по време на изследването. Растенията трябва да се отглеждат в непорести пластмасови или глазирани саксии с табли или чинийки под саксиите. Саксиите могат да бъдат премествани периодично, за да се

▼ **M6**

сведе до минимум варирането в растежа на растенията (дължащо се на разлики в условията на изпитване в рамките на съоръженията за регулиране на растежа). Саксиите следва да бъдат достатъчно широки, за да позволяват нормален растеж.

23. Хранителните вещества в почвата могат да бъдат допълнени според необходимостта, за да се поддържа добра жизненост на растенията. Необходимостта от допълнителни хранителни вещества и и моментът на подаването им могат да се преценят чрез наблюдение на контролните растения. Препоръчва се дънно напояване на изпитвателните съдове (например чрез използване на фитили от стъклена вата). Независимо от това, първоначалното напояване отгоре може да се използва за стимулиране на покълването на семената, а при прилагане на повърхността на почвата то улеснява навлизането на химикала в почвата.
24. Специфичните условия за отглеждане следва да са подходящи за изпитваните растителни видове и за изпитвания химикал, предмет на проучването. Контролните и третираните растения трябва да се съхраняват при същите условия на околната среда, като обаче следва да бъдат взети подходящи мерки, за да не се допусне кръстосана експозиция на изпитвания химикал (напр. при летливи химикали) между различни третирани и контролни растения.

Изпитване при единична концентрация/доза

25. За да се определи подходящата концентрация/доза на даден химикал за провеждане на изпитване при единична концентрация или доза (предизвикваща/гранична следва да бъдат взети предвид редица фактори. За общите химикали те включват физичните/химичните свойства на химикала. При продуктите за растителна защита трябва да бъдат взети предвид физичните/химичните свойства и начинът на употреба на изпитвания химикал, неговата максимална концентрация или приложена доза, броят прилагания на сезон и/или устойчивостта му. За да се определи дали един общ химикал притежава фитотоксични свойства, може да е целесъобразно той да се изпита при максимално равнище от 1 000 mg/kg суха почва.

Изпитване за определяне на обхвата

26. Когато е необходимо, може да се извърши изпитване за определяне на обхвата, за да се предоставят насоки относно концентрациите/дозите, които да бъдат изпитвани в окончателно изследване на зависимостта доза-отклик. За изпитването за определяне на обхвата изпитваните концентрации/дозы следва да бъдат широко раздалечени (напр. 0,1, 1,0, 10, 100 и 1 000 mg/kg суха почва). При продуктите за растителна защита концентрациите/дозите могат да се основават на препоръчаната или максимално допустимата концентрация или доза, напр. 1/100, 1/10, 1/1 от препоръчаната/максимално допустимата концентрация или доза на прилагане.

Изпитване при множество концентрации/дозы

27. Целта на изпитването при множество концентрации/дозы е да се установи зависимостта доза-отклик и да се определи стойност на EC_x или ER_x за въздействия върху поникването, биомасата и/или видимите белези в сравнение с неекспонираните контроли, както се изисква от регулаторните органи.
28. Броят и раздалечеността на концентрациите или дозите следва да бъде достатъчен, за да осигури надеждна зависимост доза-отклик и регресионно уравнение и да даде оценка за стойностите на EC_x или ER_x . Избраните концентрации/дозы следва да обхващат стойностите на EC_x или ER_x , които трябва да бъдат определени. Например, ако е необходима стойност на EC_{50} , би било желателно да се проведе изпитване с дози, които предизвикват въздействие от 20 до 80 %. Препоръчаният в изпитването брой концентрации/дозы за постигането на тази цел, е най-малко пет в геометрична прогресия плюс нетретирана контролна група, раздалечени една от друга с кратност, която

▼ **M6**

не надвишава три. За всяка третирана и контролна група броят на отделните повторения следва да е най-малко четири и общият брой на семената следва да бъде най-малко 20. При някои растения с ниска кълняемост или вариращ растеж може да са необходими повече повторения за увеличаване на статистическата мощност на изпитването. Ако са използвани по-голям брой изпитвани концентрации/доза, броят на повторенията може да бъде намален. Ако трябва да се оценя НОЕС, може да са необходими повече повторения, за да се получи желаната статистическа мощност (23).

Наблюдения

29. По време на периода на наблюдение, а именно от 14 до 21 дни след поникването на 50 % от контролните растения (също и при контролите на разтворител, ако е приложимо), растенията се наблюдават често (най-малко веднъж седмично и, ако е възможно, ежедневно) за поникване, визуални признаци на фитотоксичност и смъртност. В края на изпитването следва да се запишат измереният процент на поникване и биомасата на преживелите растения, както и видимите неблагоприятни въздействия върху различните части на растението. Последните включват аномалии във външния вид на поникналите понизи, забавен растеж, хлороза, обезцветяване, смъртност и въздействия върху развитието на растенията. Крайната биомаса може да бъде измерена чрез крайната средна стойност на теглото на понизите на преживелите растения, като поникът се взема от повърхността на почвата нагоре и се изсушава до постоянно тегло при температура от 60 °C. Като алтернатива, крайната биомаса може да бъде измерена с използване на свежото тегло на понизите. Височината на понизите може да бъде друга крайна точка, ако това се изисква от регулаторните органи. За оценка на наблюдаемия токсичен отклик следва да се използва единна скала по отношение на видимите увреждания. Примери за извършването на качествена и количествена визуална оценка по скала са дадени в (23) (24).

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Статистически анализ***Изпитване при единична концентрация/доза*

30. Данните за всеки растителен вид следва да се анализират чрез използване на подходящ статистически метод (21). Следва да се протоколира както степента на въздействие при изпитваната концентрация/доза, така и невъзможността да се постигне дадено въздействие при изпитваната концентрация/доза (напр. $< x$ % наблюдавано въздействие при y концентрация или доза).

Изпитване при множество концентрации/доза

31. Установява се зависимост доза-отклик под формата на регресионно уравнение. Могат да се използват различни модели: Така например при поникването, за оценка на стойностите на EC_x или ER_x (напр. EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) и техните доверителни граници като двоични данни могат да бъдат подходящи методите логит, пробит, на Вейбул, на Спирмън-Карбър, на Спирмън-Карбър с изключване на данни и други. При растежа на понизите (тегло и височина) крайните точки EC_x или ER_x и техните доверителни граници като непрекъснати величини могат да се оценят с използване на подходящ регресионен анализ (напр. нелинеен регресионен анализ на Брус-Верстейг (25)). Където е възможно, R^2 следва да бъде 0,7 или по-висок за най-чувствителните растителни видове и използваните изпитвани концентрации/доза следва да обхващат 20 % до 80 % въздействия. Ако трябва да се оценя НОЕС, следва да се предпочете прилагането на мощни статистически тестове и те трябва да се избират въз основа на разпределението на данните (21) (26).

Протокол от изпитването

32. Протоколът от изпитването следва да представя резултатите от изследванията, както и подробно описание на условията на изпитване, задълбочено обсъждане на резултатите, анализ на данните и направените заключения от анализа. Трябва да бъдат представени в табличен вид обобщение и резюмирана информация за резултатите. Протоколът трябва да включва следното:

▼ M6*Изпитван химикал:*

- данни за идентификацията на химикала, относими свойства на изпитвания химикал (например $\log P_{ow}$, разтворимост във вода, парното налягане и информация за съдбата и поведението му в околната среда, ако са налични);
- подробни данни относно приготвянето на разтвора за изпитване и проверката на изпитваните концентрации, както е посочено в точка 18.

Изпитван растителен вид:

- подробни данни относно изпитвания организъм: растителен вид/сорт, семейство, научни и общоприети наименования, източник и история на семената възможно най-подробно (т.е., име на доставчика, процент на кълняемост, клас по размер на семената, номер на партида или на пратка, година за семената или вегетативен период, през който са събрани, дата за кълняемостта), жизнеспособност и т.н.;
- брой на изпитаните едноседелни и двуседелни видове;
- обосновка за избора на растителните видове;
- описание на съхранението, третирането и поддръжката на семената.

Условия на изпитване:

- съоръжение за изпитване (напр. климатична камера, вегетационна къща и оранжерия);
- описание на системата за изпитване (например, размери и материал, от който е направена саксията и количества почва);
- характеристики на почвата (текстура или тип на почвата: разпределение и класификация на почвените частици, физични и химични свойства, включително % органична материя, % съдържание на органичен въглерод и рН);
- приготвяне на почвата/субстрата (напр. почва, изкуствена почва, пясък и др.) преди изпитването;
- описание на хранителната среда, ако е използвана такава;
- прилагане на изпитвания химикал: описание на метода на прилагане, описание на оборудването, дозите на експозиция и обемите, включително проверка на химикала, описание на метода за калибриране и описание на условията на околната среда по време на прилагането;
- условия на растеж: светлинен интензитет (напр. фотосинтетично активно излъчване), времетраене на осветлението, максимални/минимални температури, график и метод за напояването, торене;
- брой семена в саксия, брой растения на доза, брой повторения (саксии) на доза на експозиция;
- тип и брой на контролите (негативни и/или положителни контроли, контроли на разтворител, ако се използват);
- продължителност на изпитването.

Резултати:

- таблица с всички крайни точки за всяко повторение, изпитвана концентрация/доза и растителен вид;
- броят и процентът на поникване в сравнение с контролите;
- измервания на биомасата на растенията (сухо или свежо тегло на поничите) като процент от стойността при контролите;

▼ **M6**

- височина на пониците на растенията като процент от стойността при контролите, ако се измерва;
- процент видими увреждания и количествено и качествено описание на видимите увреждания (хлороза, некроза, увяхване, деформация на листата и стъблото, както и всякаква липса на въздействие) в резултат от изпитвания химикал в сравнение с контролните растения;
- описание на скалата, използвана за преценка на видимите увреждания, ако е правена визуална преценка;
- за проучвания с една доза следва да се протоколира процентът на уврежданията;
- Стойностите на EC_x или ER_x (напр. EC_{50} , ER_{50} , EC_{25} , ER_{25}) и свързаните с тях доверителни граници. Където е извършен регресионен анализ, се предоставят стандартната грешка за регресионното уравнение, както и стандартна грешка на оценката на отделния параметър (напр. наклон, отсечка);
- стойностите на NOEC (и LOEC), ако са изчислени;
- описание на статистическите процедури и направените допускания;
- графично представяне на тези данни и на зависимостта доза-отклик при изпитвания растителен вид.

Отклонения от процедурите, описани в настоящия метод за изпитване, и всички необичайни обстоятелства по време на изпитването.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Schrader G., Metge K., and Bahadir M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. *Applied Soil Ecology*, 7, 189-193.
- (2) International Organisation of Standards. (1993). ISO 11269-1. Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth.
- (3) International Organisation of Standards. (1995). ISO 11269-2. Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants.
- (4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1663-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.
- (5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.
- (6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:
 - 850.4000: Background — Non-target Plant Testing;
 - 850.4025: Target Area Phytotoxicity;
 - 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);
 - 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;
 - 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;
 - 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.
- (7) AFNOR, X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993) Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.
- (8) Boutin, C., Freemark, K.E. and Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series No.145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.

▼ M6

- (9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., and Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms — A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. No 48.
- (10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., and Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.
- (11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).
- (12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J. ed. *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, pp. 163-206.
- (13) Beall, M.L., Jr. and Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.
- (14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R. and Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.
- (15) U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 pp., FDA, Washington, DC.
- (16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. and Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174
- (17) Boutin, C.; Elmegaard, N. and Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.
- (18) Boutin, C., and Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides — An analysis with two databases. Ecotoxicology vol.9(4):255-271.
- (19) Boutin, C. and Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.
- (20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P. and Maguire, R.J.. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.
- (21) OECD (2006). Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (22) Hatzios, K.K. and Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1-63.
- (23) Hamill, P.B., Marriage, P.B. and G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25:386-389.
- (24) Frans, R.E. and Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. In: B. Truelove (Ed.) Research Methods in Weed Science, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.
- (25) Bruce, R.D. and Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485-1492.
- (26) Глава В.33 от настоящото приложение: Изпитване за размножаване на земни червей (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*).

▼ **M6***Допълнение 1***Определения**

Активна съставка (a.i.) (или активно вещество (a.s.)) е материал, предназначен за предизвикване на специфично биологично въздействие (напр. контрол на насекоми, борба с болести по растенията, борба с плевели в третираната площ), известно също като активна съставка или активно вещество с квалификация „технически чист“.

Химикал означава вещество или смес.

Продукти за растителна защита или пестициди са материали със специфична биологична активност, целенасочено използвани за растителна защита от вредители (например гъбични болести, насекоми и конкурентни растения).

EC_x, концентрация с въздействие x % или ER_x, доза с въздействие x % е концентрацията или дозата, в резултат от която се получава нежелано изменение или промяна от x % в изпитваната крайна точка, която се измерва, по отношение на контролата (напр. 25 % или 50 % намаляване на поникването на пониците, тегло на пониците, краен брой налични растения или увеличение на видимите увреждания би представлявало съответно EC₂₅/ER₂₅ или EC₅₀/ER₅₀).

Поникване е появата на колеоптила или на котиледон над повърхността на почвата.

Формулировка е наличният в търговската мрежа формулиран продукт, съдържащ активното вещество (активната съставка), известен също като краен продукт ⁽¹⁾ или типичен продукт за крайно потребление.

ЛОЕС (най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект) е най-ниската концентрация на изпитвания химикал, при която е наблюдавано въздействие. В настоящото изпитване концентрацията, съответстваща на ЛОЕС, има статистически значимо ($p < 0,05$) въздействие в рамките на даден период на експозиция, при сравнение с контролата, и е по-висока от NOЕС.

Неприцелни растения: Тези растения, които са извън прицелната растителна площ. При продуктите за растителна защита това обикновено се отнася за растения извън третираната площ.

NOЕС (концентрация без наблюдавано въздействие) е най-високата концентрация на изпитвания химикал, при която не е наблюдавано въздействие. В настоящото изпитване концентрацията, съответстваща на NOЕС, няма статистически значимо ($p < 0,05$) въздействие в рамките на даден период на експозиция, при сравнение с контролата.

Фитотоксичност: Неблагоприятни отклонения (от оценки от измервания и от визуални оценки) от обичайния външен вид и растеж на растения като отклик на даден химикал.

Повторение е опитната единица, която представлява контролната група и/или третираната група. В разглежданите изследвания за повторение е определена саксията.

Визуална оценка: преценка за видимо увреждане, основавана на наблюдение на стъблостой, жизненост, малформация, хлороза, некроза и цялостен изглед в сравнение с контрола.

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

⁽¹⁾ Окончателно приготвяне: формулираният продукт, съдържащ активния химикал (активната съставка), който се продава в търговската мрежа.

▼ M6

Допълнение 2

Списък на растителните видове, за които съществуват данни за използването им за изпитване на растения през предходни периоди

Семейство	Вид	Общоприети наименования
<i>DICOTYLEDONAE</i>		
Apiaceae (Umbelliferae)	<i>Daucus carota</i>	Морков
Asteraceae (Сложноцветни)	<i>Helianthus annuus</i>	Слънчоглед
Asteraceae (Сложноцветни)	<i>Lactuca sativa</i>	Марули
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Sinapis alba</i>	Бял синап
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica campestris</i> var. <i>chinensis</i>	Китайско зеле
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica napus</i>	Рапица
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Бяло зеле
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica rapa</i>	Ряпа
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Lepidium sativum</i>	Градински кресон
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Raphanus sativus</i>	Репички
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Захарно цвекло
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	Краставици
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Glycine max</i> (<i>G. soja</i>)	Соя
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus aureus</i>	Боб мунг
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Фасул пешак, нисък френски фасул, градински фасул
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Pisum sativum</i>	Грах
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Сминдух
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Lotus corniculatus</i>	Звездан обикновен
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trifolium pratense</i>	Детелина червена
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Vicia sativa</i>	Фий
Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i>	Лен
Polygonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Елда
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicon</i>	Домат

▼ **M6**

Семейство	Вид	Общоприети наименования
<i>MONOCOTYLEDONAE</i>		
Liliaceae (Amaryllada- ceae)	<i>Allium cepa</i>	Лук
Poaceae (Gramineae)	<i>Avena sativa</i>	Овес
Poaceae (Gramineae)	<i>Hordeum vulgare</i>	Ечемик
Poaceae (Gramineae)	<i>Lolium perenne 0-3</i>	Английски райграс
Poaceae (Gramineae)	<i>Oryza sativa</i>	Ориз
Poaceae (Gramineae)	<i>Secale cereale</i>	Ръж
Poaceae (Gramineae)	<i>Sorghum bicolor</i>	Сорго на зърна, сорго
Poaceae (Gramineae)	<i>Triticum aestivum</i>	Пшеница
Poaceae (Gramineae)	<i>Zea mays</i>	Царевица

Списък на възможните неземеделски растителни видове

Възможни растителни видове на ОИСП за изпитване за токсичност.

Бележка: В таблицата по-долу се предоставя информация за 52 неземеделски растителни вида (за всяко вписване в скоби е посочена референтна информация). Предоставената информация за кълняемостта е от публикуваната литература и служи само като общи насоки. Индивидуалният опит може да варира в зависимост от източника на семената и други фактори.

СЕМЕЙСТВО Вид Ботаническо наименование (Общоприето наименование на български език)	Продължителност на живота (1) и местообитание	Тегло на семето (mg)	Времетраене на осветлението за покълване и растеж (2)	Дълбочина на засаждане (mm) (3)	Време до покълване (дни) (4)	Специален режим на третиране (5)	Изпитване за токсичност (6)	Доставчици на семената (7)	Друга референтна информация (8)
APIACEAE <i>Torilis japonica</i> (японски торилис)	А, В нарушени терени, живи плетове, пасища (16, 19)	1,7 — 1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	студена стратификация (7, 14, 18, 19) може да е необходимо зреене (19) покълването се потиска от тъмнина (1, 19) няма специални третираня (5)	POST (5)		
ASTERACEAE <i>Bellis perennis</i> (многогодишна паричка)	Р пасища, обработваеми земи, торф (16, 19)	0,09-0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	покълването не е засегнато от лъчение (18, 19) няма специални третираня (4, 14)	POST (4)	A, D, F	7
<i>Centaurea cyanus</i> (Обикновена метличина)	А полета, крайпътни пространства и открити местообитания (16)	4,1-4,9 (4, 14)	L = D (14)	0-3 (2, 4, 14)	14-21 (100 %) (14)	няма специални третираня (2, 4)	POST (2,4)	A, D, E, F	7
<i>Centaurea nigra</i> (вид червена метличина)	Р полета, крайпътни пространства и открити местообитания (16, 19)	2,4-2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	може да е необходимо зреене (18, 19) покълването се потиска от тъмнина (19) няма специални третираня (5, 14, 26)	POST (5, 22, 26)	A	
<i>Inula helenium</i> (бял оман)	Р влажни, нарушени терени (16)	1 — 1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		няма специални третираня (4)	POST (4)	A, F	

▼ M6

СЕМЕЙСТВО Вид Ботаническо наименование (Общоприето наименование на български език)	Продължителност на живота (1) и местообитание	Тегло на семето (mg)	Времетраене на осветлението за покълване и растеж (2)	Дълбочина на засаждане (mm) (3)	Време до покълване (дни) (4)	Специален режим на третиране (5)	Изпитване за токсичност (6)	Доставчици на семената (7)	Друга референтна информация (8)
<i>Leontodon hispidus</i> (космата жълтица)	Р полета, крайпътни пространства, нарушени терени (16, 19)	0,85 -1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	покълването се потиска от тъмнина (17, 18, 19) няма специални третираня (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
<i>Rudbeckia hirta</i> (влакнеста рудбекия)	В, Р нарушени 16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	няма специални третираня (4, 14, 33)	POST (4, 33)	С, D, E, F	
<i>Solidago canadensis</i> (канадски енчец)	Р пасища, открити терени (16)	0,06-0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14-21 (11)	разбърква се с равна част пясък и се напоява в 500 ppm GA в течение на 24 часа (11) няма специални третираня (4)	POST (4)	E, F	
<i>Xanthium pensylvanicu</i> (влакнест казашки бодил, разновидност canadense)	А полета, открити местообитания (16)	25-61 (14, 29)		0(1) 5(29)		покълването може да се потиска от тъмнина (1) потапяне в топла вода в течение на 12 часа (29)	PRE & POST (31)	А	
<i>Xanthium spinosum</i> (влакнест казашки бодил)	А открити местообитания (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 6)		скарификация (14) няма специални третираня (6)	PRE & POST (6)	А	
<i>Xanthium strumarium</i> (влакнест казашки бодил)	А полета, открити местообитания (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		няма специални третираня (6, 14, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	А	
BRASSICACEAE <i>Card amine pratensis</i> (ливадна горва)	Р полета, крайпътни пространства, торф (6, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	покълването се потиска от тъмнина (18, 19) няма специални третираня (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	

▼ M6

СЕМЕЙСТВО Вид Ботаническо наименование (Общоприето наименование на български език)	Продължителност на живота ⁽¹⁾ и местообитание	Тегло на семето (mg)	Времетраене на осветлението за покълване и растеж ⁽²⁾	Дълбочина на засаждане (mm) ⁽³⁾	Време до покълване (дни) ⁽⁴⁾	Специален режим на третиране ⁽⁵⁾	Изпитване за токсичност ⁽⁶⁾	Доставчици на семената ⁽⁷⁾	Друга референтна информация ⁽⁸⁾
CARYOPHYLLACEAE <i>Lychnis flos-cuculi</i> (румянка)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	може да е необходимо зреене (18) няма специални третираня (5, 14, 15, 22-26)	POST (5, 15, 22-26)	F	
CHENOPODIACEAE <i>Chenopodium album</i> (бяла куча лобода)	A синорни ивици, нарушени терени (16, 19)	0,7 — 1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	третирането е различно в зависимост от цвета на семената (19) покой на семето при съхранение на сухо (19) покълването се потиска от тъмнина (1, 18, 19) студена стратификация (18) няма специални третираня (14, 34)	PRE & POST (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE <i>Hypericum perforatum</i> (жълт кантарион)	P полета, обработваеми земи, открити местообитания (16, 19)	0,1-0,23 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	покълването се потиска от тъмнина (1, 18, 19) няма специални третираня (5, 14, 15, 25, 27)	POST (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE <i>Ipomoea hederacea</i> (бръшляноподобна ипомея)	A полета, открити местообитания, ниви (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	покълването не е засегнато от лъчение (1) няма специални третираня (6, 21)	PRE & POST (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE <i>Cyperus rotundus</i> (лилава острица)	P обработваеми земи, пасища, крайпътни пространства (16, 30)	0,2 (14)	L = D (14)	0 (1) 10-20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	покълването се потиска от тъмнина (1) няма специални третираня (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE <i>Lotus corniculatus</i> (обикновен звездан)	P тревисти райони, крайпътни пространства, открити местообитания (16, 19)	1-1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	скарификация (14, 19) покълването не е засегнато от лъчение (18, 19) няма специални третираня (23, 25)	POST (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼ M6

СЕМЕЙСТВО Вид Ботаническо наименование (Общоприето наименование на български език)	Продължителност на живота ⁽¹⁾ и местообитание	Тегло на семето (mg)	Времетраене на осветлението за покълване и растеж ⁽²⁾	Дълбочина на засаждане (mm) ⁽³⁾	Време до покълване (дни) ⁽⁴⁾	Специален режим на третиране ⁽⁵⁾	Изпитване за токсичност ⁽⁶⁾	Доставчици на семената ⁽⁷⁾	Друга референтна информация ⁽⁸⁾
<i>Senna obtusifolia</i> (китайска сена, тьполистна касия)	A влажни гори (16)	23-28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10-20 (6,9)		потопяне на семената във вода в продължение на 24 часа (9) скарификация (14) жизнеспособността на семената се различава в зависимост от цвета (1) няма специални третирия (6)	POST (6,9)	A	
<i>Sesbania exaltata</i> (Сесбания екзалтата)	A алувиални почви (16)	11 — 13 (9, 14)	L > D (9)	10-20 (9, 21)		потопяне на семената във вода в продължение на 24 часа (9) покълването не е засегнато от лъчение (1) няма специални третирия (21)	PRE & POST (9, 21, 28, 31)	A	
<i>Trifolium pratense</i> ливадна детелина	P полета, крайпътни пространства, обработваеми земи (16, 19)	1,4 — 1,7 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	скарификация (14, 18) може да е необходимо зреене (19), покълването не е засегнато от лъчение (1, 19) няма специални третирия (5)	POST (5)	A, E, F	
LAMIACEAE <i>Leonurus cardiaca</i> (дяволска уста)	P открити местообитания (16)	0,75-1,0 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		няма специални третирия (4, 14)	POST (4)	F	
<i>Mentha spicata</i> (обикновена мента)	P влажни зони (16)	2,21 (4)		0 (4)		няма специални третирия (4)	POST (4)	F	
<i>Nepeta cataria</i> (коча билка обикновена)	P нарушени терени (16)	0,54 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		няма специални третирия (2, 4, 14)	POST (2,4)	F	

▼ M6

СЕМЕЙСТВО Вид Ботаническо наименование (Общоприето наименование на български език)	Продължителност на живота (1) и местообитание	Тегло на семето (mg)	Времетраене на осветлението за покълване и растеж (2)	Дълбочина на засаждане (mm) (3)	Време до покълване (дни) (4)	Специален режим на третиране (5)	Изпитване за токсичност (6)	Доставчици на семената (7)	Друга референтна информация (8)
<i>Prunella vulgaris</i> (обикновена прищница)	Р обработваеми полета, тревисти площи, нарушени терени (16, 19)	0,58-1,2 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	покълването се потиска от тъмнина (18, 19) покълването е по-голямо при по-големи семена (1,) няма специални третираня (4, 14, 22)	POST (4, 22)	A, F	
<i>Stachys officinalis</i> (лечебен ранилист)	Р тревни съобщества, синорни ивици (19)	14-18 (14, 19)	L = D (14)		7 (50 %) (19)	няма специални третираня (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
MALVACEAE <i>Abutilon theophrasti</i> (просфорник)	A полета, открити местообитания (16)	8,8 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	скарификация (14) няма специални третираня (5, 10, 21)	PRE & POST (6, 22, 28, 31)	A, F	
<i>Sida spinosa</i> (Сида спиноза)	A полета, крайпътни пространства (6, 19)	3,8 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		скарификация (14) покълването не е засегнато от лъчение (1) няма специални третираня (6, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE <i>Papaver rhoeas</i> (полски мак)	A полета, обработваеми земи, нарушени терени (16, 19)	0,1-0,3 (4, 14, 19, 29)	L = D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	студена стратификация и скарификация (1, 19, 32) няма специални третираня (4, 14, 29)	POST (4)	A, D, E, F, G	
POACEAE <i>Agrostis tenuis</i> (обикновена полевица)	тревни площи, пасища (16)	0,07 (14)	L > D (Ю)	20 (10)	10 (62 %) (10)	покълването се потиска от тъмнина (1, 17-19) няма специални третираня (10)	POST (10)	A, E	
<i>Alopecurus myosuroides</i> (полска класица)	A полета, открити местообитания (16)	0,9-1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	скарификация (14) третира се със 101 mg/l KNO ₃ (14) топла стратификация (1) покълването се потиска от тъмнина (1) няма специални третираня (34)	PRE & POST (28, 34)	A	32

▼ M6

СЕМЕЙСТВО Вид Ботаническо наименование (Общоприето наименование на български език)	Продължителност на живота (1) и местообитание	Тегло на семето (mg)	Времетраене на осветлението за покълване и растеж (2)	Дълбочина на засаждане (mm) (3)	Време до покълване (дни) (4)	Специален режим на третиране (5)	Изпитване за токсичност (6)	Доставчици на семената (7)	Друга референтна информация (8)
<i>Avena fatua</i> (див овес)	A обработваеми площи, открити местообитания (16)	7-37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10-20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	скарификация (7, 32) покълването се потиска от тъмнина (1) студена стратификация (1, 18) няма специални третираня (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 10, 28, 31)	A	
<i>Bromus tectorum</i> (покривна овсига)	A полета, крайпътни пространства, обработваеми земи (16)	0,45-2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		период на зреене (1, 7, 32) покълването се потиска от светлина (1) няма специални третираня (14)	PRE & POST (28, 31)	A	
<i>Cynosurus cristatus</i> (обикновен сеноклас)	P полета, крайпътни пространства, открити местообитания (16, 19)	0,5-0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	покълването не е засегнато от лъчение (19) няма специални третираня (14, 29)	POST (5)	A	
<i>Digitaria sanguinalis</i> (кървава росичка)	A полета, торф, открити местообитания (16)	0,52-0,6 (14, 30)	L = D (14)	10-20 (21)	7 (75 %) (7) 14 (94 %) (7)	скарификация, студена стратификация (1, 7, 14, 32) третира се със 101 mg/l KNO ₃ (14) покълването се потиска от тъмнина (1) няма специални третираня (21)	PRE & POST (18, 25, 31)	A	
<i>Echinochloa crus-galli</i> (дараджан)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10-20 (7, 21)		скарификация (7, 32) покълването не е засегнато от лъчение (1) няма специални третираня (3, 14, 21)	PRE & POST (3, 21, 28, 31)	A	
<i>Elymus canadensis</i> (Елимус канаденсис)	P крайречни зони, нарушени терени (16)	4-5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14-28 (11)	няма специални третираня (2, 11)	POST (2)	C, D, E	
<i>Festuca pratensis</i> (ливадна власатка)	P полета, влажни зони (16, 19)	1,53-2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	няма специални третираня (10, 19)	POST (10)	A	7

▼ M6

СЕМЕЙСТВО Вид Ботаническо наименование (Общоприето наименование на български език)	Продължителност на живота (1) и местообитание	Тегло на семето (mg)	Времетраене на осветлението за покълване и растеж (2)	Дълбочина на засаждане (mm) (3)	Време до покълване (дни) (4)	Специален режим на третиране (5)	Изпитване за токсичност (6)	Доставчици на семената (7)	Друга референтна информация (8)
<i>Hordeum pusillum</i> (вид дребен ечемик)	A пасища, крайпътни пространства, открити местообитания (16)	3,28 (14)				топла стратификация (1) покълването не е засегнато от лъчение (1)	PRE (31)		7
<i>Phleum pratense</i> (ливадна тимотейка)	P пасища, обработваеми полета, нарушени терени (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	покълването се потиска от тъмнина (19) покълването не е засегнато от лъчение (17) няма специални третираня (10, 14, 17, 19)	POST (10)	A, E	
POLYGONACEAE <i>Polygonum convolvulus</i> (повегицово пипериче)	A открити местообитания, крайпътни пространства (16)	5-8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		студена стратификация в продължение на 4-8 седмици (1, 2, 4, 20, 29) покълването не е засегнато от лъчение (1)	PRE & POST 1, 2, 20, 28, 31	A	32
<i>Polygonum lapathifolium</i> (лападоволисто пипериче)	A влажни почви (16)	1,8-2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	покълването не е засегнато от излъчване (1) покълването се потиска от тъмнина (18) студена стратификация (1) няма специални третираня (5)	PRE & POST (6)	A, E	
<i>Polygonum pennsylvanicum</i> (пенсилванско пипериче)	A полета, открити местообитания (16)	3,6-7 (14, 29)		2 (29)		студена стратификация в продължение на 4 седмици при 0-5 °C (1, 29), покълването се потиска от тъмнина (1)	PRE (31)	A, E	
<i>Polygonum periscaria</i> (обикновено пипериче)	A нарушени терени, обработваеми земи (16, 19)	2,1 -2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	скарификация, студена стратификация (14) третира се с GA (17-19) покълването се потиска от тъмнина (19) няма специални третираня (13)	POST (13)	A	32

▼ M6

СЕМЕЙСТВО Вид Ботаническо наименование (Общоприето наименование на български език)	Продължителност на живота (1) и местообитание	Тегло на семето (mg)	Времетраене на осветлението за покълване и растеж (2)	Дълбочина на засаждане (mm) (3)	Време до покълване (дни) (4)	Специален режим на третиране (5)	Изпитване за токсичност (6)	Доставчици на семената (7)	Друга референтна информация (8)
<i>Rumex crispus</i> (къдрав лапад)	Р обработваеми полета, крайпътни пространства, открити зони (16, 19)	1,3-1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	покълването се потиска от тъмнина (18, 19) може да е необходимо зреене (18) няма специални третираня (4, 14, 33)	POST (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE <i>Anagallis arvensis</i> (полско огнивче)	A обработваеми полета, открити терени, нарушени терени (16, 19)	0,4-0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	студена стратификация, третиране с GA (1,14, 18, 19, 32), за покълване е необходима светлина (1) няма специални третираня (2, 4)	POST (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE <i>Ranunculus acris</i> (лютиче обикновено)	Р обработваеми полета, крайпътни пространства, открити зони (16, 19)	1,5-2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41 -56 (19, 29)	няма специални третираня (5, 14, 22, 24-26)	POST (5, 22, 24-26)		32
ROSACEAE <i>Geum urbanum</i> (градско омайниче)	Р живи плетове, влажни зони (16, 19)	0,8 — 1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	покълването се потиска от тъмнина (18, 19) топла стратификация (1) няма специални третираня (5, 14, 22, 25, 26)	POST (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE <i>Galium aparine</i> (лепка)	A обработваеми полета, влажни зони, нарушени терени (16, 19)	7-9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	студена стратификация (1, 18, 19), покълването не е засегнато от лъчение (18, 19) покълването се потиска от светлина (1) няма специални третираня (6, 14)	PRE & POST (6, 28)	A	32

▼ M6

СЕМЕЙСТВО Вид Ботаническо наименование (Общоприето наименование на български език)	Продължителност на живота ⁽¹⁾ и местообитание	Тегло на семето (mg)	Времетраене на осветлението за покълване и растеж ⁽²⁾	Дълбочина на засаждане (mm) ⁽³⁾	Време до покълване (дни) ⁽⁴⁾	Специален режим на третиране ⁽⁵⁾	Изпитване за токсичност ⁽⁶⁾	Доставчици на семената ⁽⁷⁾	Друга референтна информация ⁽⁸⁾
<i>Galium mollugo</i> (меко енъовче)	Р насипи, открити райони (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		няма специални третираня (5, 14, 22, 24, 26, 29)	POST (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE <i>Digitalis purpurea</i> (червен напръстник)	В, Р живи плетове, открити райони (16, 19)	0,1-0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	покълването се потиска от тъмнина (1, 17-19) няма специални третираня (4, 22-26)	POST (4, 22 — 26)	D, G, F	
<i>Veronica persica</i> (персийско великденче)	A обработваеми полета, открити терени, нарушени терени (16, 19)	0,5-0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18)	покълването се потиска от тъмнина (18, 19) студена стратификация (18) няма специални третираня (14)	PRE & POST (28)	A	32

⁽¹⁾ A = едногодишни растения, В = двугодишни растения, Р = многогодишни растения.

⁽²⁾ Позовавания 11,14 и 33 се отнасят за съотношението светлина (L) и тъмнина (D), необходимо за предизвикване на покълването на семената. Позовавания 3, 6, 9, 10, 13, 20 се отнасят за условията за отглеждане в оранжерии.

⁽³⁾ 0 mm показва, че семената се засети върху повърхността на почвата, или че семената имат нужда от светлина, за да покълнат.

⁽⁴⁾ посоченият брой представлява броят дни, през които е покълнал даден процент семена според предоставеното позоваване, напр. 3 дни (50 %) покълване (позоваване 19).

⁽⁵⁾ продължителност на зрееенето и/или стратификацията не винаги са на разположение. С изключение на изискванията към студеното третиране, не са посочени температурните условия, тъй като при изпитванията в оранжерии контролът върху температурата е органичен. Повечето семена покълват при нормалните колебания на температурата, срещани се в оранжерии.

⁽⁶⁾ посочва кои видове са използвани при включващо хербициди изпитване за токсичност преди поникването (PRE) и/или след поникването (POST).

⁽⁷⁾ дава пример(и) на доставчици на семена от търговската мрежа.

⁽⁸⁾ предлага две алтернативни позовавания, които са били консултирани.

▼ **M6****Цитирани доставчици на семена**

Идентификатор на доставчика	Информация за доставчика
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ ENGLAND +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 USA (727) 344 — 4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla — Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 CANADA (519) 586 — 3985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 USA (303) 431 — 7333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 USA (800) 873 — 3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB ENGLAND +44 1229 581137 www.chilternseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 CANADA (800) 274 - 7333 www.thompson-morgan.com

ЦИТИРАНИ ПОЗОВАВАНИЯ

- (1) Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto
- (2) Blackburn, L.G. & Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). *Ecotoxicology*, 12:271-285.
- (3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 19(10):2532-2541.
- (4) Boutin, C., Elmegaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. *Ecotoxicology*, 13:349-369.
- (5) Breeze, V., Thomas, G., & Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. *Annals of Applied Biology*, 121:669-677.
- (6) Brown, R.A., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: *Plants for toxicity assessment: 2nd volume*. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, & M.A. Lewis, eds. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. pp 197 — 208.

▼ **M6**

- (7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.
- (8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge
- (9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. *Weed Science*, 48:481-486.
- (10) Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC — Weeds. pp. 151 — 156.
- (11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Personal communication. (www.ernstseed.com)
- (12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 9:769-776.
- (13) Fletcher, J.S., Pflieger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 15(7):1189-1196.
- (14) Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgekew.org.uk/data/sid)
- (15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. *Environmental Pollution*, 114:21-28.
- (16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY
- (17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. *Annals of Applied Biology*, 98:555-558.
- (18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. *Journal of Ecology*, 69:1017-1059.
- (19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London
- (20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (*Polygonum convolvulus* L.). *Weed Research*, 34:453-459.
- (21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. *Weed Science*, 40:227-232.
- (22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. *Environmental Pollution*, 59:71-86.
- (23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. *Environmental Pollution*, 69:223-235.
- (24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. *Environmental Pollution*, 73:25-42.
- (25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. *Agriculture, Ecosystems, & Environment*, 45:283-293.

▼ M6

- (26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. *Journal of Environmental Management*, 50:369-388.
- (27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. *BCPC — Weeds*, pp. 1021-1028.
- (28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. *Pest Management Science*, 58:1161-1174.
- (29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (<http://www.herbi-seed.com>)
- (30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (<http://plants.usda.gov>). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA
- (31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].
- (32) Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.
- (33) White, A. L. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Personal communication.
- (34) Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. *Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh.*, 17:711-718.

▼ M6*Допълнение 4***Примери за подходящи условия за растеж за някои растителни видове**

Следните условия са възприети като подходящи за 10 растителни вида и могат да бъдат използвани като насоки за изпитвания в климатични камери, също така при някои други растителни видове:

Концентрация на въглероден диоксид: 350 ± 50 ppm;

Относителна влажност: 70 ± 5 % през светлите периоди и 90 ± 5 % през тъмните периоди;

Температура: 25 ± 3 °C през деня, 20 ± 3 °C през нощта;

Времетраене на осветлението: 16 часа светлина/8 часа тъмнина при средна дължина на вълната от 400 до 700 nm;

Светлина: яркост 350 ± 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, измерена непосредствено над листата.

Растителните видове са:

- домати (*Solanum lycopersicon*);
- краставици (*Cucumis sativus*);
- марули (*Lactuca sativa*);
- соя (*Glycine max*);
- зеле (*Brassica oleracea var. capitata*);
- моркови (*Daucus carota*);
- овес (*Avena sativa*);
- английски райграс (*Lolium perenne*);
- царевица (*Zea mays*);
- лук (*Allium cepa*).

▼ M6

V.32. ИЗПИТВАНЕ ЗА РАЗМНОЖАВАНЕ НА ПРЕДСТАВИТЕЛИ НА СЕМ. ENCHYTRAEIDAE

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСР (TG) 220 (2004). Той е предназначен да бъде използван за оценяване на въздействието на химикали върху репродуктивната способност в почвата на червеи от вида *Enchytraeus albidus* Henle 1873. Той се основава главно на метод, разработен от Агенцията по околна среда, Германия (1), който е бил предмет на кръгово изпитване (2). Други методи за изпитване на токсичността на химикали към представители на сем. Enchytraeidae и земни червеи също са взети предвид (3) (4) (5) (6) (7) (8).

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

2. Обитаващите почвата прешленести червеи от род *Enchytraeus* са екологично значими видове по отношение на екотоксикологичните изпитвания. Докато представителите на сем. Enchytraeidae се срещат често в почвите, обитавани от земни червеи, вярно е също така, че те често са в изобилие в много почви, които не са обитавани от земни червеи. Представителите на сем. Enchytraeidae могат да се използват при лабораторни изпитвания, както и в полуполеви и полеви изследвания. От практическа гледна точка много видове от род *Enchytraeus* са лесни за боравене и отглеждане и тяхното време за създаване на поколение е значително по-кратко от това на земните червеи. Продължителността на едно изпитване за размножаване на представители на сем. Enchytraeidae следователно трае само 4-6 седмици, докато при земните червеи (*Eisenia fetida*) то е 8 седмици.
3. Основна информация относно екологията и екотоксикологията на представителите на сем. Enchytraeidae в сухоземни условия могат да бъдат намерени в (9) (10) (11) (12).

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

4. Възрастни (полово зрели) представители на сем. Enchytraeidae се експонират на диапазон от концентрации на изпитвания химикал, примесен с изкуствена почва. Изпитването може да бъде разделено на две стъпки: а) изпитване за определяне на обхвата, в случай че не е налице достатъчно информация, при която смъртността е основната крайна точка, оценена след две седмици експозиция, и б) окончателното изпитване за размножаване, в което се оценяват общият брой на ювенилните екземпляри, произлезли от родител, и преживяването на родителите. Продължителността на окончателното изпитване е шест седмици. След първите три седмици полово зрелите червеи се отстраняват и морфологичните промени се записват. След още три седмици се отчита броят на новоизлюпените от пашкулчетата червеи, произлезли от полово зрели индивиди. Репродуктивната способност на животните, експонирани на изпитвания химикал, се сравнява с тази на контролата(ите), за да се определи (i) концентрацията без наблюдавано въздействие (НОЕС) и/или (ii) EC_x (напр. EC_{10} , EC_{50}), като се използва регресионен модел, за да се оцени концентрацията, която би причинила x % намаляване в репродуктивната способност. Изпитваните концентрации трябва да обхващат EC_x (напр. EC_{10} , EC_{50}), така че EC_x впоследствие да се получи след интерполация, вместо след екстраполация.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНИЯ ХИМИКАЛ

5. Разтворимостта във вода, $\log K_{ow}$, коефициентът на разпределение почва-вода (вж. напр. глава В.18 или В.19 от настоящото приложение) и парното налягане на изпитвания химикал следва да са известни. Желателно е да е налична допълнителна информация относно съдбата на изпитвания химикал в почвата, като например скоростите на фотолиза и хидролиза.
6. Този метод за изпитване може да се използва за разтворими във вода и неразтворими химикали. Начините на прилагане на изпитвания химикал обаче съответно ще се различават. Методът за изпитване е неприложим за летливи химикали, т.е., химикали, за които константата на Хенри или коефициентът на разпределение въздух-вода е по-голям от единица, или за химикали, при които парното налягане превишава 0,0133 Pa при 25 °C.

▼ **M6****ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО**

7. За да бъде изпитването валидно, при контролите следва да се изпълнят следните критерии:
- Смъртността при възрастните индивиди не трябва да превишава 20 % в края на изпитването за определяне на обхвата и след първите три седмици от изпитването за размножаване.
 - Ако се предположи, че са били използвани 10 възрастни индивиди на съд при подготвянето на изпитването, в края му трябва да са получени средно най-малко 25 ювенилни индивиди на съд.
 - Коефициентът на вариация около средната величина на ювенилните индивиди не трябва да е по-голям от 50 % в края на изпитването за размножаване.

Когато дадено изпитване не отговаря на посочените по-горе критерии, то следва да бъде прекратено, освен ако не може да бъде предоставена обосновка за продължаването му. Обосновката следва да се включи в протокола от изпитването.

РЕФЕРЕНТЕН ХИМИКАЛ

8. Референтният химикал или трябва да се изпитва редовно, или евентуално да бъде включен във всяко изпитване, за да се провери дали откликът на изпитваните организми не се е променил значително с течение на времето. Подходящ референтен химикал е карбендазим, за когото е било доказано, че оказва въздействие върху преживяването и размножаването на представителите на сем. *Enchytraeidae* (13) (14), като също могат да бъдат използвани и други химикали, при които данните за токсичността са добре известни. В кръгово изпитване е използвана формулировка на карбендазим, известна с търговското наименование DegosaTM, доставена от AgrEvo Company (Франкфурт, Германия) и съдържаща 360 g/l (32,18 %) активна съставка (2). Стойността на EC₅₀ за размножаването, определена в кръговото изпитване, е в интервала 1,2 ± 0,8 mg активна съставка (a.i.) на kg суха маса (2). Ако в поредицата изпитвания е включена положителна стандартна проба за токсичност, използва се една концентрация, като броят на отделните повторения следва да е същият като този при контролите. По отношение на карбендазим се препоръчва изпитване с 1,2 mg a.i./kg сухо тегло (изпитва се във вид на течна формулировка).

ОПИСАНИЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**Оборудване**

9. Съдовете за изпитване следва да са направени от стъкло или друг химически инертен материал. Подходящи са стъклени буркани (напр. с обем: 0,20—0,25 литра; диаметър: ≈ 6 cm). Съдовете следва да са с прозрачни капаци (напр. стъкло или полиетилен), които са разработени така, че да намаляват изпаряването на водата, като същевременно дават възможност за газообмен между почвата и атмосферата. Капаците следва да бъдат прозрачни, за да се позволи пропускането на светлина.
10. Необходимо е обикновено лабораторно оборудване, по-специално следното:
- сушилна камера;
 - стереомикроскоп;
 - рН-метър и фотометър;
 - подходящи точни везни;
 - подходящо оборудване за контрол на температурата;
 - подходящо оборудване за контрол на влажността (не е от съществено значение, ако съдовете за експозицията са снабдени с капаци);
 - инкубатор или малко помещение с климатик;
 - пинсети, куки или примки;
 - фотографска вана.

Приготвяне на изкуствената почва

11. В настоящото изпитване се използва изкуствена почва (5)(7) със следния състав (на базата на сухо тегло след изсушаване до постоянно тегло при температура от 105 °C):

▼ M6

- 10 % торфен мъх, изсушен на въздух и фино смлян (приема се размер на частиците от 2 ± 1 mm); препоръчва се да се провери дали преди използване в изпитването дадена почва, приготвена с прясна партида торф, е подходяща за отглеждане на червеите;
- 20 % каолин (за предпочитане съдържанието на каолинит да е над 30 %);
- приблизително от 0,3 до 1,0 % калциев карбонат (CaCO_3 на прах, с квалификация „чист“) за получаване на рН, равно на $6,0 \pm 0,5$; количеството на калциевия карбонат за добавяне може да зависи основно от качеството/естеството на торфа;
- приблизително 70 % кварцов пясък, изсушен на въздух (в зависимост от количеството на необходимия CaCO_3), предимно фин пясък с над 50 % от частиците между 50 и 200 микрона.

Преди използването на почвата в окончателното изпитване е препоръчително да се демонстрира пригодността на изкуствената почва за отглеждането на червеите и за постигането на критериите за валидност на изпитването. Особено е препоръчително да се направи такава проверка, за да се гарантира, че ефективността на изпитването не е изложена на риск, ако съдържанието на органичен въглерод в изкуствената почва се намали, например чрез понижаване на съдържанието на торф до 4 — 5 % и съответно повишаване на 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. Беше показано, че *Enchytraeus albidus* може да изпълни критериите за валидност по отношение на размножаването, когато се изпитва в естествени почви с по-ниско съдържание на органичен въглерод от упоменатото по-горе (напр. 2,7 %) (15), като е експериментално установено, макар и в ограничен мащаб, че това може да се постигне и в изкуствена почва със съдържание на торф 5 %.

Забележка: Когато се използва естествена почва в допълнително изпитване (напр. изпитване на по-високо стъпало), следва също да бъдат доказани пригодността на почвата и постигането на критериите за валидност на изпитването.

12. Сухите съставки на почвата се смесват старателно (напр. в голямо лабораторно устройство за смесване). Това следва да се извърши най-малко една седмица преди началото на изпитването. Смесената почва следва да се съхранява в продължение на два дни, за да се достигне равновесие при киселинността/да се стабилизира киселинността. За определянето на рН се използва смес от почва и разтвор на 1 М калиев хлорид (KCl) или 0,01 М калциев хлорид (CaCl_2) в съотношение 1:5 (вж. (16) и Допълнение 3). Ако почвата е по-киселинна от изисквания диапазон (вж. точка 11), може да бъде коригирана чрез добавяне на подходящо количество CaCO_3 . Ако почвата е твърде алкална, може да се коригира чрез добавяне на повече от сместа, посочена в параграф 11, но без съдържание на CaCO_3 .
13. Максималната способност за задържане на вода (СЗВ) на изкуствената почва се определя в съответствие с процедурите, описани в допълнение 2. Един или два дни преди началото на изпитването сухата изкуствена почва предварително се навлажнява чрез добавяне на дейонизирана вода, до получаване на приблизително половината от крайното съдържание на вода, което представлява 40 до 60 % от максималната способност за задържане на вода. В началото на изпитването предварително навлажнената почва се разделя на части, съответстващи на

▼ M6

броя изпитвани концентрации (и референтен химикал, когато е целесъобразно) и контроли. Влажността се коригира до 40—60 % от максималната СЗВ чрез добавяне на разтвор на изпитвания химикал и/или като се добавя дестилирана или дейонизирана вода (вж. точки 19—21). Съдържанието на влага се измерва в началото и в края на изпитването (чрез изсушаване до постоянно тегло при 105 °C) и следва да бъде в оптимални граници за преживяването на червеите. Приблизителна проверка на съдържанието на влага в почвата може да се извърши чрез леко стискане в ръка на почвата — ако съдържанието на влага е коректно, трябва между пръстите да се появят малки капки вода.

Избор и подготвяне на изпитваните животински видове

14. Препоръчаният за изпитването вид е *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (бял червей), представител на семейство Enchytraeidae (клас Oligochaeta, тип Annelida). *E. albidus* е един от най-големите видове измежду представителите на семейство Enchytraeidae, като е съобщавано за екземпляри, достигащи дължина до 35 mm (17) (18). *Enchytraeus albidus* се среща по целия свят в морски, сладководни и сухоземни местообитания, главно в разлагаща се органична материя (водорасли, компост) и рядко по ливади (9). Неговата широка екологична толерантност и някои морфологични изменения може да показват, че съществуват различни подвидове.
15. *Enchytraeus albidus* е достъпен в търговската мрежа като храна за риби. Следва да се провери дали отгледаните екземпляри не са замърсени от други, обикновено по-дребни видове (1) (19). Ако е налице замърсяване, всички червеи следва да се измият с вода в стъкло на Петри. След това следва да се изберат едри полови зрели екземпляри от *E. albidus* (с използване на стереомикроскоп) за започване на нова култура, като всички други червеи се отстраняват. *E. albidus* може да се отглежда лесно в широка гама от органични материали (виж допълнение 4). Жизненият цикъл при *E. albidus* 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 безпроблемно в лаборатория в продължение на най-малко 5 седмици (едно поколение).
16. Други видове от род *Enchytraeus* също са подходящи, напр. *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 или *E. crypticus* Westheide & Graefe 1992 (вж. допълнение 5). Ако се използват други видове от род *Enchytraeus*, те следва да бъдат ясно определени и да се отчетат причините за избора им.
17. При изпитванията се използват полови зрели червеи. Те следва да имат яйца (бели точки) в областта на клителума и да са с приблизително еднакъв размер (около 1 см в дължина). Синхронизиране при отглеждането им не е необходимо.
18. Ако представителите на семейство Enchytraeidae не са отгледани в същия тип почва и при условията (включително хранене), използвани при крайното изпитване, те трябва да бъде аклиматизирани в продължение на най-малко 24 часа и най-много до три дни. Първоначално следва да бъде аклиматизиран по-голям брой полови зрели индивиди в сравнение с необходимите за извършване на изпитването, за да се остави възможност за отстраняване на увредени или други неподходящи екземпляри. В края на периода на аклиматизация единствено червеите, които са с яйца и не проявяват поведенчески отклонения (например, опити да избягат от почвата) се избират за изпитването. Червеите внимателно се отстраняват, като се използват мека златарска пинсета, куки или примки, и се поставят в блюдо на Петри, съдържащо малко количество прясна вода. Възстановената сладка вода, както е предложено в глава В.20 от настоящото приложение („тест за възпроизвеждане на гигантска водна бълха“) се предпочита за целта, тъй като дейонизираната, деминерализираната или чешмяната вода биха могли да навредят на червеите. Червеите се проверяват под стереомикроскоп и всички, които не съдържат яйца, се отстраняват. Вземат се мерки за отстраняване и изхвърляне на всички акари или колемболи, които може да са заразили културите. Здравите червеи, които не се използват за изпитването, се връщат в изходната култура.

▼ M6**Приготвяне на концентрации за изпитване***Разтворим във вода изпитван химикал*

19. Разтвор на изпитвания химикал се приготвя в дейонизирана вода в количество, достатъчно за всички повторения на една концентрация за изпитване. Препоръчително е да се използва подходящо количество вода до достигане на изискуемото съдържание на влага, т.е., 40—60 % от максималната СЗВ (вж. точка 13). Всеки разтвор на изпитвания химикал се смесва старателно с една партида от предварително навлажнена почва, преди да бъде внесен в съда за изпитване.

Неразтворим във вода изпитван химикал

20. За химикалите, които са неразтворими във вода, но разтворими в органични разтворители, изпитваният химикал може да бъде разтворен във възможно най-малък обем подходящ носител (напр. ацетон). Следва да се използват само летливи разтворители. Носителят се разпръсква върху малко количество фин кварцов пясък, например 2,5 g, или се смесва с него., Носителят се отстранява чрез изпаряване в лабораторна камина в продължение най-малко на един час. Сместа от кварцов пясък и изпитван химикал се добавя в предварително навлажнената почва и старателно се смесва, след добавяне на подходящо количество дейонизирана вода, за да се получи необходимото съдържание на влага. Крайната смес се въвежда в съдовете за изпитване.
21. За малко разтворимите във вода и в органични разтворители химикали, еквивалентът на 2,0—2,5 g фино стрит кварцов пясък на изпитвателен съд се смесва с количеството изпитван химикал, 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, след добавяне на подходящо количество дейонизирана вода, за да се получи необходимото съдържание на влага. Крайната смес се разпределя между съдовете за изпитване. Процедурата се повтаря за всяка концентрация за изпитване, като се приготвя и подходяща контролна проба.
22. Химикали обикновено не следва да се изпитват в концентрации, по-високи от 1 000 mg/kg суха маса почва. Изпитването при по-високи концентрации обаче може да се изисква в съответствие с целите на определено изпитване.

ПРОВЕЖДАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**Групи на изпитване и контроли**

23. За всяка концентрация за изпитване в съда за изпитване (вж. точки 19-21) се поставя количество почва за изпитване, съответстващо на 20 g сухо тегло. Приготвят се и контролите без изпитвания химикал. Към всеки съд се добавя храна в съответствие с процедурите, описани в точка 29. Десет червея се разпределят на случаен принцип във всеки съд за изпитване. Червеите внимателно се прехвърлят във всеки съд за изпитване и се поставят върху повърхността на почвата, например чрез използване на мека златарска пинсета, куки или примки. Броят на повторенията за концентрациите за изпитване и за контролите зависи от използвания план за изпитването (вж. точка 34). Съдовете за изпитване се поставят в инкубатор за изпитване на случаен принцип и тези позиции се разместват веднъж седмично, също на случаен принцип.
24. Ако за прилагане на изпитвания химикал се използва носител, една поредица контроли, съдържащи кварцов пясък, напръскани или смесени с разтворител, следва да бъдат включени допълнително към изпитваните поредици. Концентрацията на разтворителя или на диспергиращото средство следва да е същата, като използваната в съдовете за изпитване, съдържащи изпитвания химикал. Една поредица контроли, съдържаща допълнително кварцов пясък (2,5 g за всеки съд) следва да бъде приготвена за химикали, които изискват прилагане в съответствие с процедурите, описани в точка 21.

▼ **M6****Условия на изпитването**

25. Температурата на изпитването е 20 ± 2 °C. С цел да не се насърчава избягването на червеи от почвата, изпитването се провежда при контролирани цикли светлина-тъмнина (за предпочитане 16 часа светлина и 8 часа тъмнина) с осветление от 400 до 800 lux в зоната на съдовете за изпитване.
26. С цел проверка на влажността на почвата, съдовете се претеглят в началото на изпитването и един път седмично след това. Загубата на тегло се запълва чрез добавяне на подходящо количество дейонизирана вода. Следва да се отбележи, че загубата на вода може да се намали чрез поддържане на висока влажност на въздуха в инкубатора за изпитване (> 80 %).
27. Съдържанието на влага и стойността на рН трябва да се измерят в началото и в края както на изпитването за определяне на обхвата, така и на окончателното изпитване. Измерванията трябва да се извършват в контролните и третираните почвени проби (всички концентрации), подготвени и поддържани по същия начин като изпитваните култури, но несъдържащи червеи. Храна следва да се добавя само към тези почвени проби в началото на изпитването за улесняване на микробната активност. Количеството на храната следва да бъде същото като добавеното към изпитваните култури. Не е необходимо да се добавя допълнително храна към тези съдове по време на изпитването.

Хранене

28. Може да се използва храна, която е в състояние да поддържа популацията от представители на сем. Enchytraeidae. Сплескани овесени ядки, за предпочитане обработени в автоклав преди употреба, за да се избегне микробно замърсяване (загряване също е целесъобразно), се считат за подходящ материал за храненето.
29. Храната се предоставя най-напред чрез смесване на 50 mg смлени сплескани овесени ядки с почвата във всеки съд, преди въвеждането на червеите. След това храна се доставя седмично до ден 21. Хранене не се извършва в ден 28, тъй като на този етап полово зрелите индивиди се отстраняват, а ювенилните червеи се нуждаят от сравнително малко допълнителна храна след този ден. Храненето по време на изпитването се състои от 25 mg смлени сплескани овесени ядки на съд, поставени внимателно върху повърхността на почвата, така че да се избегне нараняването на червеите. С цел да се намали растежът на гъбички, овесените ядки трябва да се зароят в почвата, като се покриват с малки количества от почвата. Ако храната остава неизядена, дажбата трябва да бъде намалена.

План за изпитването за определяне на обхвата

30. Когато е необходимо, се провежда изпитване за определяне на обхвата, например за пет концентрации на изпитвания химикал от 0,1, 1,0, 10, 100 и 1 000 mg/kg (сухо тегло на почвата). За всяка третирана и контролна проба е достатъчно едно повторение.
31. Продължителността на изпитването за определяне на обхвата е две седмици. В края на изпитването се оценява смъртността на червеите. Червеят се отчита като мъртъв, когато не реагира на механичен стимул в предния край. Допълнителна информация за смъртността може също да бъде полезна при вземането на решение за диапазона на концентрациите, които да се използват в окончателното изпитване. Промени в поведението (напр. не е способен да копае в почвата; лежи неподвижно срещу стъклената стена на съда за изпитване) и морфологията (напр. наличие на открити рани) на полово зрелите индивиди също следва да бъдат записвани заедно с наличието на ювенилни екземпляри. Последното може да се определи с помощта на метода с оцветяване, описан в допълнение 6.
32. Стойността на LC₅₀ може да бъде приблизително определена чрез изчисляване на геометричната средна стойност от данните за смъртността. При определяне на диапазона на концентрациите за окончателното изпитване, въздействието върху размножаването се приемат с по-ниска стойност от стойността на LC₅₀ с коефициент в размер до 10. Това обаче е емпирична зависимост и във всеки конкретен случай би могла да бъде различна. Допълнителните наблюдения при изпитването за определяне на обхвата, като срещането на ювенилни екземпляри,

▼ M6

могат да допринесат за по-точно определяне на диапазона на концентрациите на изпитвания химикал, които да се използват за окончателното изпитване.

33. С цел точно определяне на LC_{50} се препоръчва изпитване с използване най-малко на четири повторения за всяка от концентрациите на изпитвания химикал, и достатъчен брой концентрации за получаване на най-малко четири статистически значими различни средни отклика при тези концентрации. Когато се прилагат контроли, за тях се използва подобен брой концентрации и повторения.

План за окончателното изпитване за размножаване

34. Въз основа на препоръките от кръгово изпитване се предлагат три вида планове (2)

— За определяне на NOEC следва да се изпитат най-малко пет концентрации в геометрична прогресия. Препоръчват се четири повторения за всяка концентрация за изпитване, плюс осем контроли. Концентрациите трябва да бъдат разделени една от друга с кратност, която не превишава 1,8.

— За определяне на EC_x (напр. EC_{10} , EC_{50}) следва да се изпитат поне пет концентрации, като те трябва да обхващат EC_x , за да се даде възможност за определяне на EC_x чрез интерполация, а не чрез екстраполация. Препоръчват се най-малко по четири повторения за всяка изпитвана концентрация и четири контролни повторения. Кратността на разделянето може да варира, т.е., да е по-малка или равна на 1,8 в диапазона на очакваното въздействие и над 1,8 при по-високите и по-ниските концентрации.

— Комбиниран подход дава възможност за едновременно определяне на NOEC и EC_x . Следва да бъдат използвани осем концентрации на третиране в геометрична прогресия. Препоръчват се четири повторения за всяко третиране, плюс осем контроли. Концентрациите трябва да бъдат разделени една от друга с кратност, която не превишава 1,8.

35. Трябва да бъдат използвани по десет полови зрели червея на съд за изпитване (вж. точка 23). Храната се добавя в стъклените съдове за изпитване в началото на теста, след това веднъж седмично (вж. точка 29) включително до ден 21. В ден 21 почвените проби се подлагат на внимателно ръчно претърсване и живите полови зрели червеи се наблюдават и отчитат и се записват промените в поведението (напр. неспособност да се копае в почвата; лежане неподвижно срещу стъклената стена на съда за изпитване) и морфологията (напр. наличие на открити рани). След това всички полови зрели червеи се отстраняват от съдовете за изпитване и от изпитваната почва. Използваната при изпитването почва и всички получени пашкулчета, съдържащи се в нея, се инкубират в продължение на три допълнителни седмици при същите условия на изпитване, с изключение на това, че храненето се извършва само в ден 35 (т.е. 25 mg смлени сплескани овесени ядки, за всеки съд).

36. След шест седмици новоизлюпените червеи се преброяват. Методът, основан на оцветяване в бенгалско червено (вж. допълнение 6), се препоръчва, въпреки че други техники, като извличане с вода (но не с топлина) и флотация (вж. допълнение 6), също са се оказали подходящи (4) (10) (11) (20). Оцветяването в бенгалско червено се препоръчва, тъй като извличането с вода от почвата може да се възпрепятства от мътност, причинена от суспендирани частици глина.

Гранично изпитване

37. Ако при изпитването за определяне на обхвата не се наблюдават въздействия при най-високата концентрация (т.е. 1 000 mg/kg), изпитването за размножаването може да бъде проведено като гранично изпитване, като се използва 1 000 mg/kg, за да се покаже, че NOEC за размножаването е по-висока от тази стойност.

▼ M6

Обобщение и график за провеждане на изпитването

38. Етапите на изпитването могат да бъдат обобщени както следва:

Време	Изпитване за определяне на обхвата	Окончателно изпитване
Ден – 7 или по-рано	— приготвяне на изкуствена почва (смесване на сухи съставки)	— приготвяне на изкуствена почва (смесване на сухи съставки)
Ден – 5	— проверява се рН на изкуствената почва — измерва се максималната СЗВ на почвата	— проверява се рН на изкуствената почва — измерва се максималната СЗВ на почвата
Ден – 5 до – 3	— сортиране на червеите с оглед на аклиматизацията	— сортиране на червеите с оглед на аклиматизацията
Ден – 3 to 0	— червеите се аклиматизират в продължение на поне 24 часа	— червеите се аклиматизират в продължение на поне 24 часа
Ден – 1	— предварително намокряне на изкуствената почва и разделяне на партиди	— предварително намокряне на изкуствената почва и разделяне на партиди
Ден 0	— приготвят се изходни разтвори — прилага се изпитваният химикал — претегляне на изпитвания субстрат в съдовете за изпитване — смесване на храната — въвеждане на червеите — измерване на рН и съдържанието на влага на почвата	— приготвят се изходни разтвори — прилага се изпитваният химикал — претегляне на изпитвания субстрат в съдовете за изпитване — смесване на храната — въвеждане на червеите — измерване на рН и съдържанието на влага на почвата
Ден 7	— проверка на съдържанието на влага на почвата	— проверка на съдържанието на влага на почвата — фуражи
Ден 14	— определяне на смъртността при полово зрелите индивиди — оценка на броя ювенилни индивиди — измерване на рН и съдържанието на влага на почвата	— проверка на съдържанието на влага на почвата — хранене
Ден 21		— наблюдение на поведението на полово зрелите индивиди — отстраняване на полово зрелите индивиди — определяне на смъртността при полово зрелите индивиди — проверка на съдържанието на влага на почвата — фуражи
Ден 28		— проверка на съдържанието на влага на почвата — без хранене
Ден 35		— проверка на съдържанието на влага на почвата — хранене
Ден 42		— преброяване на ювенилните червеи — измерване на рН и съдържанието на влага на почвата

▼ **M6****ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ****Обработка на резултатите**

39. Въпреки че в допълнение 7 е направен общ преглед, в настоящия метод за изпитване не се дават окончателни насоки за статистически анализ на резултатите от изпитването.
40. В изпитването за определяне на обхвата основната крайна точка е смъртността. Промени в поведението (напр. неспособност за копаене в почвата; лежане неподвижно срещу стъклената стена на съда за изпитване) и морфологията (напр. открити рани) на полово зрелите индивиди следва обаче също да бъдат записвани, заедно с наличието на ювенилни екземпляри. Обичайно за определяне на LC_{50} следва да се прилагат пробит-анализ (21) или логистична регресия. Независимо от това в случаите, когато този метод за анализ е неподходящ (например, ако на разположение са по-малко от три концентрации с частично проявена смъртност), могат да се използват алтернативни методи. Тези методи могат да включват хлъзгащи средни (22), метод на Спирмън-Карбър с изключване на данни (23) или обикновена интерполация (напр. геометрична средна стойност на LC_0 и LC_{100} , изчислена чрез корен квадратен на LC_0 , умножена по LC_{100}).
41. При окончателното изпитване крайна точка на изпитване е плодовитостта (т.е. брой на получените ювенилни индивиди). Независимо от това, също както и при изпитването за определяне на обхвата, всички други признаци за неблагоприятно въздействие трябва да бъдат записани в окончателния протокол. За изчисляване на размножаването статистическият анализ изисква средноаритметичната стойност и стандартното отклонение за всяко отделно третиране и за контролата.
42. Ако е направен дисперсионен анализ, стандартното отклонение s и степените на свобода df могат да бъдат заменени съответно с обединената оценка на дисперсията, получена от ANOVA, и от нейните степени на свобода, при условие че дисперсията не зависи от концентрацията. В такъв случай се използват единичните дисперсии на контролната и на третираните проби. Тези стойности обикновено се изчисляват с търговски статистически софтуер, с използване на резултатите по съдове като повторения. Ако обединяването на данни за негативните контроли и контролите на разтворител изглежда поразумно, отколкото изпитването само на една от тях, те трябва да бъдат тествани дали не са значимо различни (за подходящи тестове вж. точка 45 и допълнение 7).
43. Допълнителното статистическо тестване и статистическите изводи и заключения зависят от това дали стойностите на повторенията са нормално разпределени и са с хомогенна дисперсия.

Оценка на NOEC

44. Следва да се предпочита прилагането на мощни тестове. За това дали данните са приблизително нормално разпределени следва да се използва информация, например от предходен опит с кръгови изпитвания или от други данни за предходни периоди. Хомогенността на дисперсията (хомоскедастичността) е по-важна. Опитът показва, че дисперсията често се увеличава с увеличаването на средната стойност. В тези случаи преобразуване на данните би могло да доведе до хомоскедастичност. Такава трансформация обаче следва да се основава на опита, натрупан с данните за предходни периоди, вместо с данните, които са предмет на проучването. При хомогенни данни следва да се използват множествени t -тестове като тестът на Уилямс ($\alpha = 0,05$, едностранен) (24) (25) или, в някои случаи, тестът на Дънет (26) (27). Следва да се отбележи, че в случай на неравни повторения табличните t -стойности трябва да се коригират, както се предлага от Дънет и Уилямс. В някои случаи, поради наличието на големи колебания, отклиците не се увеличават/намаляват регулярно. В този случай на голямо отклонение от монотонността тестът на Дънет е по-подходящ. Ако са налице отклонения от хомоскедастичността, може да е уместно да се проучат по-подробно възможните въздействия върху дисперсията,

▼ **M6**

за да се вземе решение дали могат да бъдат прилагани t-тестове без да се губи много мощност (28). Множествен U-тест като например U-тестът на Бонферони по Holm (29) или — когато тези данни показват хетероскедастичност, но иначе са съобразени с базисната монотонна зависимост доза-отклик — друг непараметричен тест [напр. на Йонкхере-Терпстра (30) (31) или на Шърли (32) (33)] могат да бъдат прилагани като алтернатива и като цяло се предпочитат пред t-тестовете при неравна дисперсия. (виж също и схемата в допълнение 7).

45. Ако е извършено гранично изпитване и критериите за използване на параметрични тестови процедури (нормалност, хомогенност) са изпълнени, може да се използва на t-тестът на Стюдънт за сравнения по двойки, или в противен случай — процедурата на U-теста на Ман-Уитни (29).

Оценка на ЕС_x

46. За да се изчисли стойността на ЕС_x средните стойности от всяко третиране се използват за извършване на регресионен анализ (линеен или нелинеен), след като е получена подходяща функция доза-отклик. За растежа на червеите като непрекъснат отклик стойностите на ЕС_x могат да се оценят с използване на подходящ регресионен анализ (35). Сред подходящите функции за двоични данни (смъртност/преживяване и брой получени новородени индивиди) са нормалната сигмоидна, логистичната функция или функцията на Вейбул, съдържащи от два до четири параметъра, като някои от тях могат също така да моделират хорметични отклици. Ако функция доза-отклик е била изгладена с линеен регресионен анализ, при този анализ трябва да е получен значим r^2 (коефициент на детерминация) и/или наклон преди изчисляване на ЕС_x чрез добавяне на стойност, съответстваща на x % от средната стойност на контролна проба, в полученото чрез регресионен анализ уравнение. 95 %-ните доверителни граници се изчисляват по Fieller (цитиран във Finney (21)) или с други подходящи съвременни методи.
47. Като алтернативна възможност откликът се моделира като процент или пропорция от параметър на модел, който се тълкува като средна стойност на отклика на контролната проба. В тези случаи нормалната (логистична, на Вейбул) сигмоидна крива може често да бъде лесно изгладена по отношение на резултатите, като се използва пробит-регресия (21). В тези случаи функцията на претеглянето трябва да бъде коригирана за метрични отклици, както е по Christensen (36). Въпреки това, ако е наблюдаван хормезис, пробит-анализът следва да бъде заменен с логистична функция с четири параметъра, или функция на Вейбул, изгладена чрез нелинейна регресия (36). Ако подходяща функция доза-отклик функция не може да се съгласува с данните, може да се използват алтернативни методи за оценяване на ЕС_x и нейните доверителни граници, като хлъзгащи средни по Томпсън (22) и метод на Спирмън-Карбър с изключване на данни (23).

ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

48. Протоколът от изпитването трябва да съдържа следната информация:

Изпитван химикал:

- физична природа и, където е уместно, съответните физични и химични свойства (например водоразтворимост, парно налягане);
- химична идентификация на изпитвания химикал според номенклатурата на IUPAC, номер по CAS, партида, пратка, структурна формула и чистота;
- дата на валидност на пробата;

Изпитван вид:

- използвани в изпитването животни: вид, научно наименование, източник на организмите и условия на отглеждане;

Условия на изпитване:

- съставки и приготвяне на изкуствената почва;

▼ M6

- метод за прилагане на изпитвания химикал;
- описание на условията на изпитване, включително температура, съдържание на влага, рН и др.;
- пълно описание на плана на проучването и на процедурите.

Резултати от изпитването:

- смъртност при полово зрели червеи след две седмици и брой на ювенилните екземпляри в края на изпитването за определяне на обхвата;
- смъртност при полово зрели червеи след експозиция от три седмици и пълно описание на ювенилните екземпляри в края на окончателното изпитване;
- всички наблюдавани физиологични или патологични симптоми и промени в поведението на изпитваните организми;
- стойностите на LC₅₀, NOEC и/или EC_x (напр. EC₅₀, EC₁₀) за размножаването, ако някои от тях са приложими с доверителни интервали, и графика на изгладения модел, използвана за изчисляването им, цялата информация и полезни наблюдения за тълкуване на резултатите;

Отклонения от процедурите, описани в настоящия метод за изпитване, и всички необичайни обстоятелства по време на изпитването.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen — Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.
- (2) Römbke, J. and Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 pp.
- (3) Westheide, W. and Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D. pp 497-508. Elsevier, Amsterdam,
- (4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.
- (5) Глава В.8 от настоящото приложение „Токсичност за земни червеи“
- (6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1. ISO, Geneve.
- (7) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.
- (8) Rundgren, S. and A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.
- (9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23, 217-232.
- (10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.
- (11) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

▼ M6

- (12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37, 2-29.
- (13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen — Prüfungskategorien der Forschung. UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.
- (14) Römbke, J. and Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.
- (15) Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (16) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneva.
- (17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. *Ann. Mus. Novitat.* 1902, 1-13.
- (18) Nielsen, C.O. and Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. *Natura Jutlandica* 8-9, 1-160.
- (19) Bouguenec, V. and Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (*Oligochaeta*, Enchytraeidae) et redescription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. *Ann. Limnol.* 23, 9-22.
- (20) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, *Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke* 32, 300-305.
- (21) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis* (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (22) Finney, D.J. (1978). *Statistical Method in Biological Assay*. — Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (23) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; Correction *Environ. Sci. Technol.* 12(1998), 417.
- (24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, 103-117.
- (25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, 519-531.
- (26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- (27) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20, 482-491.
- (28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? *Ecotoxicology* 7: 355-361
- (29) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- (30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, *Biometrika* 41, 133-145.
- (31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, *Indagationes Math.* 14, 327-333.
- (32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, *Applied Statistics* 28, 144-151.

▼M6

- (33) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, *Biometrics* 42, 183-186.
- (34) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). *Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research.* 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- (35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18, 213-221.
- (36) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. *Ecotox, Environ. Safety.* 25, 25-32.

▼ **M6***Допълнение 1***Определения**

За целите на настоящия метод за изпитване са използвани следните определения:

Химикал означава вещество или смес.

ЕС_x (**ефективна концентрация, при която се наблюдава x % от въздействието**) е концентрацията, която причинява x % от дадено въздействие на изпитвани организми в рамките на даден период на експозиция, при сравнение с контрола. В настоящото изпитване ефективните концентрации се изразяват като масата на изпитвания химикал към сухата маса на почвата за изпитване.

LC₀ (нелетална концентрация) е концентрацията на изпитвания химикал, която не води до летален изход при никой от експонираните изпитвани организми в рамките на даден период от време. В настоящото изпитване LC₀ се изразява като масата на изпитвания химикал към сухата маса на почвата за изпитване.

LC₅₀ (медианна летална концентрация) е концентрацията на изпитвания химикал, която води до летален изход при 50 % от експонираните изпитвани организми в рамките на даден период от време. В настоящото изпитване LC₅₀ се изразява като масата на изпитвания химикал към сухата маса на почвата за изпитване.

LC₁₀₀ (напълно летална концентрация) е концентрацията на изпитвания химикал, която води до летален изход при 100 % от експонираните изпитвани организми в рамките на даден период от време. В настоящото изпитване LC₁₀₀ се изразява като масата на изпитвания химикал към сухата маса на почвата за изпитване.

LOEC (най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект) е най-ниската концентрация на изпитвания химикал, при която е наблюдавано статистически значимо въздействие ($p < 0,05$). В настоящото изпитване LOEC се изразява като масата на изпитвания химикал към сухата маса на почвата за изпитване. Всички концентрации на изпитване, по-големи от LOEC, следва по принцип да показват въздействие, което в статистическо отношение е различно от това на контролата. Всички отклонения от посоченото по-горе по отношение на идентифицирането на LOEC трябва да бъдат обосновани в протокола от изпитването.

NOEC (концентрация без наблюдавано въздействие) е най-високата концентрация на изпитвания химикал непосредствено под LOEC, при която не се наблюдава въздействие. В настоящото изпитване концентрацията, съответстваща на NOEC, няма статистически значимо ($p < 0,05$) въздействие в рамките на даден период на експозиция, при сравнение с контролата.

Скорост на размножаването е средният брой ювенилни червеи, получени от определен брой полово зрели индивиди за времето на изпитването.

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

▼ **M6**

Допълнение 2

Определяне на максималната способност за задържане на вода**Определяне на способността за задържане на вода на изкуствената почва**

Описаният по-долу метод се счита за подходящ. Той е описан в приложение С към стандарта ISO DIS 11268-2.

Взема се определено количество (например 5 g) изпитвана почва субстрат с помощта на подходящо устройство (шнекова сонда и т.н.). Дъното на сондата се покрива с парче филтърна хартия и след напълване с вода сондата се поставя на стойка на водна баня. Сондата следва постепенно да се потапя във водата, докато водното ниво стане над повърхността на почвата. След това тя се оставя във водата за около три часа. Тъй като не цялото количество вода, абсорбирано от почвените капилляри, може да бъде задържано, почвената проба следва да се остави да се отцеди в продължение на два часа чрез поставяне на сондата върху легло от много влажен фино смлян кварцов пясък, намиращо се в затворен съд (за да се предотврати изсушаването). След това тази проба трябва да бъде претеглена и изсушена до постоянна маса при 105 °С. Способността за задържане на вода (СЗВ) може да се изчисли, както следва:

$$\text{СЗВ (в \% от сухата маса)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

където:

S = водонаситен субстрат + маса на сондата + маса на филтърната хартия

T = тара (маса на сондата + маса на филтърната хартия)

D = сухата маса на субстрата

ПОЗОВАВАНИЯ:

ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality -Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneva.

▼ M6*Допълнение 3***Определяне на стойността на рН на почвата**

Следният метод за определяне на рН на почвени проби се основава на описанието в ISO 10390 (Качество на почви. Определяне на рН).

Определено количество почва се изсушава при стайна температура в продължение на най-малко 12 часа. След това се приготвя суспензия от почвата, (съдържаща най-малко 5 грама почва) в нейния петкратен обем или в 1 М разтвор на калиев хлорид (KCl) с квалификация „чист“, или в 0,01 М разтвор на калциев хлорид (CaCl₂) с квалификация „чист“. След това суспензията се разклаща добре в продължение на пет минути. След разклащането суспензията се оставя да се утаи в продължение на най-малко 2 часа, но не повече от 24 часа. След това се измерва стойността на рН на течната фаза с помощта на рН-метър, който е бил калибриран преди всяко измерване чрез подходящ набор от буферни разтвори (напр. рН 4,0 и 7,0).

ПОЗОВАВАНИЯ:

ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneva.

▼ M6

Допълнение 4

Условия за отглеждане на *Enchytraeus* sp.

Представителите на вида *Enchytraeus albidus* от семейство Enchytraeidae (както и други видове от род *Enchytraeus*) могат да бъдат отглеждани в големи пластмасови кутии (напр. 30 × 60 × 10 cm), запълнени със смес от изкуствена почва и естествена, незамърсена градинска почва, в съотношение 1:1. Употребата на компост следва да се избягва, тъй като той може да съдържа токсични химикали, като тежки метали. Преди употреба фауната следва да бъде отстранена от почвата (например чрез дълбоко замразяване). Може също да се използва субстрат, състоящ се само от изкуствена почва, но скоростта на размножаване може да е по-ниска от скоростта, получена при смесен почвен субстрат. Използваният за отглеждането субстрат трябва да има рН от 6,0 ± 0,5.

Отглеждането става на тъмно при температура от 15 до 20 °C ± 2 °C. Температура, по-висока от 23 °C, трябва да се избягва. Почвата трябва да се съхранява влажна, но не мокра. Точното съдържание на влага в почвата се определя по появата на малки капки вода между пръстите при леко стискане на почвата. Създаването на безкислородни условия трябва да се избягва, като се гарантира, че капците на съдовете за отглеждане позволяват достатъчен газообмен с атмосферата. Почвата трябва да бъде внимателно разрохвана всяка седмица, за да се улесни аерирането.

Червеите могат да се хранят със сплескани овесени ядки. Овесените ядки трябва да се съхраняват в херметично затворени съдове, да се автоклавират или нагряват преди употреба с цел да се избегнат инфекции с брашнени акари (напр. *Glyphagus* sp., Astigmata, Acarina) или хищни акари [напр. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina]. След термична обработка храната се смила така, че да може да бъде лесно разпръсната по повърхността на почвата. От време на време сплесканите овесени ядки могат да бъдат допълвани с добавяне на витамини, мляко и масло от черен дроб на риба треска. Друг подходящ източник на храна са мая за хляб и храна за риби „Tetramin“.

Храненето се извършва приблизително два пъти седмично. Подходящо количество сплескани овесени ядки се разпръсва по повърхността на почвата или внимателно се смесва в субстрата при разрохването на почвата за улесняване на аерирането. Абсолютното количество въведена храна зависи от броя на червеите, присъстващи в субстрата. Като насока, количеството храна трябва да бъде увеличено, ако цялото въведено количество бъде консумирано в рамките на един ден от момента на въвеждането. Обратно, ако все още има останала храна на повърхността по време на второто хранене (една седмица по-късно), това количество следва да бъде намалено. Храната, заразена с гъбички, следва да бъде отстранена и заменена. След три месеца червеите следва да бъдат прехвърлени в прясно приготвен субстрат.

Условията за отглеждане се считат за задоволителни, ако червеите: а) не се опитват да напуснат субстрата, б) се движат бързо в почвата, в) имат лъскава външна повърхност без частици почва, прилепнали към нея, г) имат повече или по-малко изявен белезникав цвят, д) показват различия в наблюдаваните възрасти, е) се размножават непрекъснато.

▼ M6

Допълнение 5

Резултати от изпитванията с други видове от род *Enchytraeus*

Избор на видове

Могат да се използват видове, различни от *E. albidus*, но процедурата за изпитване и критериите за валидност следва да бъдат съответно адаптирани. Тъй като много видове от род *Enchytraeus* са лесно достъпни и да могат по удовлетворителен начин да се отглеждат в лабораторни условия, най-важният критерий за избора на видове, различни от *E. albidus*, е екологичната значимост и, в допълнение, сравнимата чувствителност. Също така може да има формални причини за промяна на вида. Например, в държави, където *E. albidus* не се среща и не може да бъде внасян (напр. поради карантинни ограничения), ще бъде необходимо да се използва друг вид от род *Enchytraeus*.

Примери за подходящи алтернативни видове

- *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992): През последните години този вид често е бил използван в изследванията за екоотоксичност поради това, че лесно се поддава на отглеждане и изпитване. Независимо от това, видът е дребен и това прави боравенето с него по-сложно, отколкото с *E. albidus* (особено на етапите преди използване на метод за оцветяване). Съществуването на *E. crypticus* в природата не е установено със сигурност, видът е бил описан само в култури на червеи. Поради това изискванията му по отношение на околната среда не са известни.
- *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Това название може би обхваща група от тясно свързани видове, които са трудно различими в морфологично отношение. Използването му за изпитване не се препоръчва докато индивидите, използвани при изпитване, не бъдат идентифицирани като видове. *Enchytraeus buchholzi* се намира обикновено в ливади и нарушени терени, като крайпътни пространства.
- *Enchytraeus luxuriosus*: Този вид е бил първоначално познат като *E. „minutus“*, но неотдавна беше описан (1). Първоначално е установен от U. Graefe (Хамбург) в ливада близост до St. Peter-Ording (Шлезвиг-Холщайн, Германия). *E. luxuriosus* е с размер приблизително половината от този на *E. albidus*, но е по-голям от другите видове, обсъдени тук; това би могло да го направи добра алтернатива на *E. albidus*.
- *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen 1963): Този вид до момента се съобщава в минерални почви от Германия и Испания, където срещането му е обичайно, но обикновено не е много разпространен. В сравнение с други малки видове от този род, той е относително лесен за разпознаване. Нищо не е известно за поведението му при лабораторни изпитвания, нито за чувствителността му към химикали. Установено е обаче, че е лесен за отглеждане (E. Belotti, лично съобщение).

Условия на отглеждане

Всички упоменати по-горе видове от род *Enchytraeus* могат да бъдат отглеждани в същите субстрати, които се използват за *E. albidus*. По-малкият им размер означава, че съдовете за отглеждане могат да са по-малки и че въпреки възможността да се използва същата храна, размерът на дажбата трябва да се коригира. Жизненият цикъл на тези видове е по-кратък от този на *E. albidus* и храненето следва да се провежда по-често.

Условия на изпитването

Условията на изпитването като цяло са същите като онези, които се прилагат за *E. albidus*, с изключение на това, че:

- размерът на съда за изпитването може (но не е задължително) да е по-малък;
- продължителността на изпитването за размножаване може (но не е задължително) да е по-малка, т.е., четири вместо шест седмици; независимо от това, продължителността на изпитването за определяне на обхвата не следва да се променя;
- с оглед на малкия размер на ювенилните червеи използването на метода на оцветяването за отчитането наистина се препоръчва;
- критерият за валидност по отношение на „брой ювенилни индивиди за един съд за изпитване в контролата“ следва да се промени на „50“.

▼ M6

ПОЗОВАВАНИЯ

- (1) Schmelz, R.M. and Collado, R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). *Carolinae* 57, 93-100.

▼ M6

Допълнение 6

Подробно описание на техниките за извличане

Оцветяване с бенгалско червено

Този метод първоначално е разработен в областта на екологията на езерата и течащите води (1) и за първи път е предложен за преброяване на ювенилните представители на семейство Enchytraeidae, в изпитвания за размножаването на представители на това семейство, от W. de Coen (Университет на Гент, Белгия). По независим път от RIVM Bilthoven е разработен модифициран вариант (бенгалско червено, смесено с формалдехид вместо етанол) (2)(3).

В края на окончателното изпитване (т.е., след шест седмици) почвата в съдовете за изпитване се прехвърля в плитък съд. Полезни за тази цел са съд Bellaplast или фотографска вана с орехово дъно, тъй като „ребрата“ ограничават движението на червеите в рамките на полето на наблюдение. Ювенилните екземпляри се фиксират с етанол (приблизително 5 ml на повторение). След това съдовете се запълват с вода до слой от 1 до 2 cm. Добавят се няколко капки (200 до 300 µl) бенгалско червено (1 % разтвор в етанол) (0,5 % еозин като алтернатива) и двете съставки се размесват внимателно. След 12 часа червеите следва да бъдат оцветени в червеникав цвят преброяването им следва да е лесно, тъй като те ще лежат върху повърхността на субстрата. Като алтернатива, преди преброяването на червеите сместа субстрат/алкохол може да се промие през сито (размер на отвора: 0,250 mm). При използването на тази процедура каолинитът, торфът и част от пясъка ще се отмият и забелязването и преброяването на оцветените в червеникав цвят червеи ще бъде по-лесно. Използването на осветени увеличителни лупи (размер на лупата най-малко 100 × 75 mm с увеличение 2× до 3×) също улеснява броенето.

Техниката с оцветяване намалява времето за преброяване до няколко минути за съд и, като насочваща информация, следва да бъде възможно едно лице да оцени всички съдове от дадено изпитване най-много за два дни.

Извличане с вода

Извличането с вода следва да започне незабавно след приключване на изпитването. Почвата от всеки съд за изпитване се поставя в пластмасови сита с размер на отвора около 1 mm. След това ситата се окачват в пластмасови купи без да се допират до дъното. Купите се напълват внимателно с вода дотогава, докато пробите в ситата са напълно под повърхността на водата. За да се осигури аналитичен добив в размер на повече от 90 % от червеите следва да се приложи извличане с продължителност от 3 дни при температура 20 ± 2 °C. В края на периода на извличането ситата се отстраняват и водата (с изключение на малко количество) бавно се декантира, като се внимава да не се засяга утайката на дъното на купите. След това пластмасовите купи леко се разклащат за суспендиране на утайката в надутаеchnата вода. Водата се прехвърля в стъкло на Петри и след утаяването на почвените частици представителите на семейство Enchytraeidae могат да бъдат идентифицирани, отстранени и преброени, като се използват стереомикроскоп и меки стоманени пинсети.

Флотация

Метод, основан на флотация, е описан в бележка от R. Kuperman (4). След фиксирането на съдържанието на съда за изпитване с етанол, почвата се напоява с Ludox (AM-30 колоиден силициев диоксид, 30 тегл. % суспензия във вода) до 10—15 mm над повърхността на почвата. След като почвата бъде добре размесена с флотационното средство в продължение на 2-3 минути, ювенилните червеи, плаващи на повърхността, могат лесно да се преброят.

ПОЗОВАВАНИЯ

- (1) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Československo Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

▼ M6

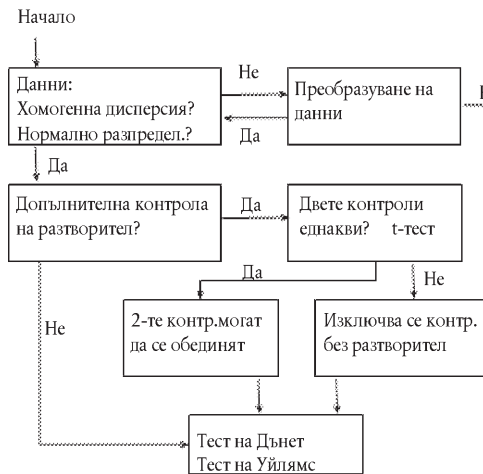
- (2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta, Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.
- (3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. and Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. *Ecotox. Envir. Safety* **38**, 108-121.
- (4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. and Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, p. 157.

▼ M6

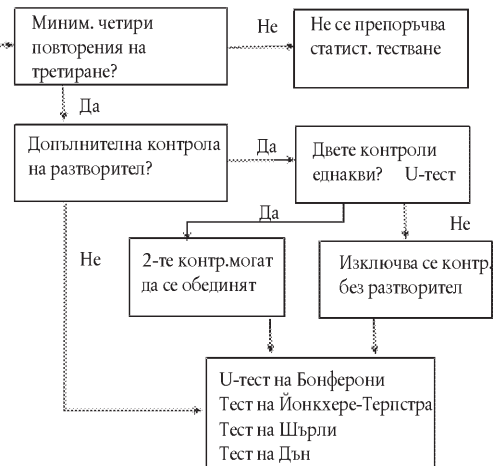
Допълнение 7

Преглед на статистическата оценка на данните (определяне на NOEC)

Параметрични тестове



Непараметрични тестове



▼ **M6****В.33. ИЗПИТВАНЕ ЗА РАЗМНОЖАВАНЕ НА ЗЕМНИ ЧЕРВЕИ
(EISENIA FETIDA/ EISENIA ANDREI)**

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСР (TG) 222 (2004). Той е предназначен да бъде използван за оценка на въздействието на химикали в почвата върху репродуктивната способност (и други сублетални крайни точки) на земни червеи от видове *Eisenia fetida* (Savigny 1826) или *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1)(2). Методът е бил обект на кръгово изпитване (3). Съществува метод за изпитване на остра токсичност при земни червеи (4). Публикувани са редица други международни и национални насоки за изпитване на остра и хронична токсичност при земни червеи (5) (6) (7) (8).
2. *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* се смятат за представители на почвената фауна и в частност на земните червеи. На разположение е обща информация за екологията на земните червеи и за използването им в екотоксикологични изпитвания (7) (9) (10) (11) (12).

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

3. Полово зрели червеи се експонират на диапазон от концентрации на изпитвания химикал или смесен в почвата, или — в случай на пестициди — прилаган във или върху почвата, при използване на процедури в съответствие с начина на употреба на химикала. Методът на прилагане е специфичен за целите на изпитването. Диапазонът от изпитвани концентрации се избира така, че да обхваща концентрациите, за които е вероятно да причинят както сублетални, така и летални последици в рамките на период от осем седмици. Въздействията върху смъртността и растежа на полово зрелите червеи се определят след 4 седмици на експозиция. След това полово зрелите индивиди се отстраняват от почвата и въздействието върху размножаването се оценява след още 4 седмици, чрез преброяване на новоизлюпените индивиди, налични в почвата. Репродуктивната способност на червеите, експонирани на изпитвания химикал, се сравнява с тази на контролата(ите), за да се определи (i) концентрацията без наблюдавано въздействие (NOEC) и/или (ii) EC_x (напр. EC_{10} , EC_{50}), като се използва регресионен модел, за да се оцени концентрацията, която би причинила x % намаляване в репродуктивната способност. Изпитваните концентрации трябва да обхващат EC_x (напр. EC_{10} , EC_{50}), така че EC_x впоследствие да се получи след интерполация, вместо след екстраполация (вж. допълнение I за определения).

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВНИЯ ХИМИКАЛ

4. Следната информация, свързана с изпитвания химикал, следва да бъде на разположение, за да се подпомогне разработването на подходящи процедури за изпитване:
 - разтворимост във вода;
 - $\log K_{ow}$;
 - парно налягане;
 - и информация за съдбата и поведението в околната среда, когато е възможно (напр. скорости на фотолиза и хидролиза, когато е приложимо към начините за прилагане).
5. Настоящият метод за изпитване е приложим за всички химикали, независимо от тяхната разтворимост във вода. Методът за изпитване е неприложим за летливи химикали, определени тук като химикали, за които константата на Хенри или коефициентът на разпределение въздух-вода е по-голям от единица, или за химикали, при които парното налягане превишава 0,0133 Ра при 25 °С.
6. При този метод за изпитване не се взема под внимание възможно разграждане на изпитвания химикал през периода на изпитването. Следователно не може да се допуска, че началните стойности на концентрациите на експозиция ще бъдат поддържани през цялото време на изпитването. В този случай се препоръчва химичен анализ на изпитвания химикал в началото и в края на изпитването.

▼ **M6****РЕФЕРЕНТЕН ХИМИКАЛ**

7. NOEC и/или EC_{50} на референтния химикал трябва да бъдат определени, за да се гарантира, че условията на лабораторното изпитване са адекватни, и да се провери дали откликът на изпитваните организми не се променя в статистическо отношение с течение на времето. Желателно е референтният химикал да се изпитва най-малко веднъж годишно или, когато изпитването се извършва по-рядко, да се извършва едновременно с определянето на токсичността на изпитвания химикал. Подходящи референтни химикали са карбендазим или беномил, за които е било доказано, че оказват въздействие върху размножаването (3). Значими въздействия следва да се наблюдават между а) 1 и 5 mg активни съставки (a.i.)/kg суха маса или б) 250-500 g/ha или 25-50 mg/m². Ако в поредицата изпитвания е включена положителна стандартна проба за токсичност, използва се една концентрация, като броят на отделните повторения следва да е същият като този при контролите.

ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

8. Следните критерии трябва да бъдат изпълнени при контролите, за да се счита за валиден даден резултат от изпитването:
- към края на изпитването от всяко повторение (съдържащо 10 полови зрели индивиди) да са получени ≥ 30 ювенилни индивиди;
 - коефициентът на вариация на размножаването да бъде ≤ 30 %;
 - смъртността при полови зрелите индивиди през първите 4 седмици от изпитването да бъде ≤ 10 %.

Когато дадено изпитване не отговаря на посочените по-горе критерии, то следва да бъде прекратено, освен ако не може да бъде предоставена обосновка за продължаването му. Обосновката следва да се включи в протокола.

ОПИСАНИЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**Оборудване**

9. Следва да се използват съдове за изпитване, изработени от стъкло или друг химически инертен материал, с обем от около един до два литра. Контейнерите трябва да са с площ на напречното сечение от около 200 cm², така че дълбочина на влажен субстрат от около 5-6 cm да се постига при добавяне на 500 до 600 g суха маса на субстрата. Видът на капачката на съда трябва да позволява газообмен между субстрата и атмосферата, и достъп до светлина (напр. при използване на перфориран прозрачен капак), като в същото време предотвратява избягването на червеи. Ако количеството на използвания изпитван субстрат е значително повече от 500 до 600 g за съд за изпитване, броят на червеите следва да бъде увеличен пропорционално.
10. Необходимо е обикновено лабораторно оборудване, по-специално следното:
- сушилна камера;
 - стереомикроскоп;
 - рН-метър и фотометър;
 - подходящи точни везни;
 - подходящо оборудване за контрол на температурата;
 - подходящо оборудване за контрол на влажността (не е от съществено значение, ако съдовете за експозицията са снабдени с капаци);
 - инкубатор или малко помещение с климатик;
 - пинсети, куки или примки;
 - водна баня.

▼ **M6****Приготвяне на изкуствената почва**

11. В това изпитване се използва изкуствена почва (5)(7) със следния състав (на базата на сухо тегло след изсушаване до постоянно тегло при температура от 105 °C):
 - 10 процента торфен мъх (с рН възможно най-близо до 5,5-6,0, без видими остатъци от растения, фино смлян, изсушен до измереното съдържание на влага);
 - 20 процента каолин (за предпочитане съдържанието на каолинит да е над 30 процента);
 - от 0,3 до 1,0 % калциев карбонат (CaCO_3 на прах, с квалификация „чист“) за получаване на първоначална стойност на рН, равна на $6,0 \pm 0,5$;
 - 70 % кварцов пясък, изсушен на въздух (в зависимост от количеството на необходимия CaCO_3), предимно фин пясък с над 50 % от частиците между 50 и 200 микрона.

Забележка 1: Изискваното количество CaCO_3 ще зависи от съставките на почвения субстрат, включително храна, и следва да бъде определено чрез измерване на почвени подпроби непосредствено преди изпитването. Стойността на рН се измерва в смес от почва и разтвор на 1 М калиев хлорид (KCl) или 0,01 М калциев хлорид (CaCl_2) (13).

Забележка 2: Възможно е също съдържанието на органичен въглерод на изкуствената почва да бъде намалено, напр. чрез понижаване на съдържанието на торф до 4—5 %, и съответно чрез повишаване на 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. Беше показано, че *Eisenia fetida* може да изпълни критериите за валидност по отношение на размножаването, когато се изпитва в естествени почви с по-ниско съдържание на органичен въглерод, напр. 2,7 % (14), като беше експериментално установено, че това може да се постигне и в изкуствена почва със съдържание на торф 5 %. Поради това не е необходимо преди използването на такава почва в окончателно изпитване да се доказва, че изкуствената почва дава възможност за съответствие на изпитването с критериите за валидност, освен ако съдържанието на торф не е намалено повече от посоченото по-горе.

Забележка 3: Когато се използва естествена почва в допълнително изпитване (напр. изпитване на по-високо стъпало), следва също да бъдат доказани пригодността на почвата и постигането на критериите за валидност на изпитването.

12. Сухите съставки на почвата се смесват старателно (напр. в голямо лабораторно устройство за смесване) на добре проветрено място. Преди началото на изпитването сухата изкуствена почва се навлажнява чрез добавяне на дейонизирана вода до получаване на приблизително половината от крайното съдържание на вода, което представлява 40 % до 60 % от максималната способност за задържане на вода (съответстващо на суха маса с 50 ± 10 % влажност). В резултат от това ще бъде получен субстрат, който при стискане в ръка не съдържа стояща вода или вода в свободно състояние. Максималната способност за задържане на вода (СЗВ) на изкуствената почва се определя в съответствие с процедурите, описани в допълнение 2, ISO 11274 (15) или еквивалентен стандарт на ЕС.
13. Ако изпитваният химикал се прилага върху повърхността на почвата или се смесва с почвата без вода, окончателното количество вода може да се смеси с изкуствената почва по време на приготвянето на почвата. Ако изпитваният химикал се смесва с почвата заедно с малко вода, допълнителното количество вода може да бъде добавено заедно с изпитвания химикал (вж. точка 19).
14. Съдържание на влага в почвата се определя в началото и в края на изпитването в съответствие с ISO 11465 (16) или еквивалентен стандарт на ЕС, рН на почвата — в съответствие с допълнение 3 или ISO 10390 (13), или еквивалентен стандарт на ЕС. Тези определяния следва да се извършват в почвена проба от контрола и в проба от почва с всяка от

▼ **M6**

изпитваните концентрации. Когато се изпитват химикали с кисела или основна реакция, стойността на рН на почвата не трябва да се коригира. Съдържанието на влага трябва да се следи по време на изпитването посредством периодично претегляне на съдовете (вж. точки 26 и 30).

Избор и подготвяне на изпитваните животински видове

15. Видовете, използвани в изпитването, са *Eisenia fetida* или *Eisenia andrei* (1)(2). За започване на изпитването са необходими притежаващи клителум полово зрели червеи на възраст между два месеца и една година. Червеите следва да бъдат избрани от синхронизирана култура с относително еднородна възрастова структура (допълнение 4). Индивидите в дадена изпитвана група не следва да се различават по възраст с повече от 4 седмици.
16. Избраните червеи следва да се аклиматизират в продължение на поне един ден към типа изкуствен почвен субстрат, който ще бъде използван за изпитването. През този период червеите следва да бъдат хранени със същата храна, която ще се използва при изпитването (вж. точки 31—33).
17. Групите от 10 червеи трябва да бъдат претеглени индивидуално, като в началото на изпитването групите се разпределят в съдове за изпитване на случаен принцип. Преди претегляне червеите се измиват (с дейонизирана вода) и излишната вода се отстранява чрез поставяне на червеите за кратко време върху филтърна хартия. Живата маса на отделните червеи, включително съдържащата се вода, следва да бъде между 250 и 600 mg.

Приготвяне на концентрации за изпитване

18. Могат да се използват два метода за прилагане на изпитвания химикал: смесване на изпитвания химикал в почвата (вж. точки 19—21), или прилагане на повърхността на почвата (вж. точки 22—24). Изборът на подходящ метод зависи от целта на изпитването. Като цяло се препоръчва смесване на изпитвания химикал в почвата. Независимо от това, може да се изискват процедури на прилагане, които са в съответствие с обичайната селскостопанска практика (например пръскане на течна формулировка или употреба на специфични пестицидни формулировки, като например гранули или продукти за третиране на семена). Разтворителите, използвани за третиране на почвата с изпитвания химикал, следва да се подбират въз основа на тяхната ниска токсичност за земните червеи, като в плана за изпитването трябва да бъде включена и подходяща контрола на разтворител (вж. точка 27).

Смесване на изпитвания химикал в почвата*Разтворим във вода изпитван химикал*

19. Разтвор на изпитвания химикал в дейонизирана вода се приготвя непосредствено преди започване на изпитването, в количество, достатъчно за всички повторения на една концентрация. За улесняване на приготвянето на разтвора за изпитване може да е необходим съразтворител. Уместно е да се приготви количество разтвор, необходимо за достигане на окончателното съдържание на влага (40 до 60 % от максималната способност за задържане на вода). Разтворът се смесва добре с почвения субстрат, преди въвеждането му в съда за изпитване.

Неразтворим във вода изпитван химикал

20. Изпитваният химикал се разтваря в малък обем подходящ органичен разтворител (например ацетон) и след това се разпръсква върху малко количество фин кварцов пясък, или се смесва с такъв. След това разтворителят се отстранява чрез изпаряване в лабораторна камина в продължение на най-малко на няколко минути. След това третираният пясък се смесва добре с предварително овлажнената изкуствена почва. След това се добавя дейонизирана вода (количество, изисквано за постигане на окончателно съдържание на влага от 40 до 60 % от максималната способност за задържане на вода) и се смесва. След това почвата е готова за поставяне в съдовете за изпитване. Следва да се обърне внимание, че някои разтворители могат да бъдат токсични за земните червеи.

▼ **M6**

Изпитван химикал, неразтворим във вода и органични разтворители

21. Приготвя се смес, състояща се от 10 г фино смлян промишлен кварцов пясък и определено количество от изпитвания химикал, необходимо за достигане на концентрацията за изпитване в почвата. След това сместа се смесва добре с предварително овлажнената изкуствена почва. След това се добавя дейонизирана вода в количество, изисквано за постигане на окончателно съдържание на влага от 40 до 60 % от максималната способност за задържане на вода, и се смесва. След това почвата е готова за поставяне в съдовете за изпитване.

Прилагане на изпитвания химикал на повърхността на почвата

22. Почвата се третира след добавянето на червеите. Отначало изпитваните съдове се запълват с овлажненния почвен субстрат и след това претеглените червеи се поставят върху повърхността. Здравите червеи обикновено се заравят незабавно в субстрата и, следователно, всички останали на повърхността след 15 минути се определят като увредени и трябва да бъдат заменени. Ако се заменят червеи, новопоставените и заменяните червеи следва да бъдат претеглени, така че в началото на изпитването да са известни общото живо тегло на експонираната група от червеи и общото тегло на съда с червеите.
23. Прилага се изпитваният химикал. Той не следва да се добавя в почвата в рамките на половин час след въвеждането на червеите (или, ако червеите се намират в почвата, на повърхността на почвата), за да се избегне всякаква пряка експозиция на изпитвания химикал чрез контакт с кожата. Когато изпитваният химикал е пестицид, може да е уместно същият да се прилага към повърхността на почвата чрез пръскане. Изпитваният химикал следва да се приложи към повърхността на почвата колкото се може по-равномерно, като се използва подходящо лабораторно устройство за пръскане с цел симулиране на прилагане чрез пръскане в полеви условия. Преди прилагането капакът на съда за изпитването следва да се отстрани и да се замени с изолация, предпазваща от пръскащото устройство страничните стени на съда. Изолацията може да бъде изработена от съд за изпитване с отстранена основа. Прилагането следва да се извършва при температура с вариране в рамките на 20 ± 2 °C и, за водни разтвори, емулсии или дисперсии, с количество прилагана вода между 600 и 800 $\mu\text{l}/\text{m}^2$. Количеството следва да се проверява с използване на подходяща техника за калибриране. Специалните формулировки, като гранули или продукти за третиране на семена, следва да се прилагат по начин, съответстващ на използването им в селското стопанство.
24. Съдовете за изпитване следва да бъдат оставени непокрити за срок от един час, за да може да се испари всякакъв летлив разтворител, свързан с прилагането на изпитвания химикал. Следва да се вземат мерки през този период нито един червей да не напусне съдовете за изпитване.

ПРОЦЕДУРА

Групи на изпитване и контроли

25. Препоръчва се въвеждане на 10 земни червея в 500—600 g суха маса от изкуствената почва (т.е. от 50 до 60 g почва на червей). Ако се използват по-големи количества почва, какъвто може да бъде случаят при изпитване на пестициди със специални режими на прилагане като например продукти за третиране на семена, отношението 50-60 g почва на червей следва да се запази чрез увеличаване на броя червеи. Десет червея се приготвят за всеки контролен съд и съд за третиране. Червеите се измиват с вода, подсушават се и се поставят върху абсорбираща хартия за кратък период от време, за отстраняване на излишното количество вода.
26. За да се избегнат системни грешки при разпределение на червеите в съдовете за изпитвателните, хомогенността на изпитваната популация следва да бъде определена чрез индивидуално претегляне на 20 червея, взети на случаен принцип от популацията, от която следва да бъдат взети изпитваните червеи. След гарантирането на хомогенността партидите от червеи се избират, претеглят се и се разпределят по съдовете за изпитване, като се използва процедура за случаен подбор. След добавянето на изпитваните червеи, следва да се измери теглото на всеки съд за изпитване, за да се гарантира, че съществува първоначално

▼ **M6**

тегло, което може да бъде използвано като основа за наблюдение на съдържанието на влага в почвата през цялото време на изпитването, както е описано в точка 30. Изпитваните съдове след това се покриват, както е описано в точка 9, и се поставят в изпитвателната камера.

27. Изготвят се подходящи контроли за всеки от методите за прилагане на изпитвания химикал, описани в точки от 18 до 24. За изготвяне на контролите се следват описаните относими процедури, с изключение на това, че не се добавя изпитваният химикал. Следователно, при необходимост към контролите се прилагат органични разтворители, кварцов пясък или други носители, в концентрации/количества, съответстващи на използваните при третиранията. Когато за добавяне на изпитвания химикал се използва разтворител или друг носител, следва да се подготви и изпита допълнителна контрола без носителя или изпитвания химикал, за да се гарантира, че носителят не влияе върху резултата.

Условия на изпитването

28. Температурата на изпитването е 20 ± 2 °C. Изпитването се провежда при контролирани цикли светлина-тъмнина (за предпочитане 16 часа светлина и 8 часа тъмнина) с осветление от 400 до 800 lux в зоната на съдовете за изпитване.
29. Съдовете за изпитване не се аерират по време на изпитването, но конструкцията на капците на съда за изпитване следва да дава възможност за газообмен, като същевременно ограничава изпаряването на влагата (вж. точка 9).
30. Съдържанието на вода в почвения субстрат в изпитваните съдове се поддържа по време на цялото изпитване чрез периодично претегляне на съдовете за изпитване (без капците им). При необходимост загубите се попълват с дейонизирана вода. Съдържанието на вода не трябва да се различава с повече от 10 % от това в началото на изпитването.

Хранене

31. Всяка храна с качество, за което е демонстрирана пригодност най-малко за поддържане на телото на червеите по време на изпитването, се счита за приемлива. Опитът показва, че овесеното брашно, говеждият или конският тор са подходяща храна. Трябва да се извършват проверки, за да се гарантира, че говедата или конете, от които се получава оборски тор, не са подложени на лекарствена терапия или лечение с химикали като стимулатори на растежа, нематоциди или подобни ветеринарни продукти, които биха могли да се отразят неблагоприятно на червеите по време на изпитването. Препоръчва се говеждият тор да бъде събиран самостоятелно, тъй като опитът показва, че наличният в търговската мрежа говежди тор, използван за наторяване на градини, може да има неблагоприятно въздействие върху червеите. Преди употреба оборският тор трябва да бъде изсушен на въздух, фино смлян и пастьоризиран.
32. Преди използването на всяка нова партида храна в изпитването, с нея трябва да бъде захранена култура от неучастващи в изпитването червеи, за да се гарантира, че партидата е с необходимото качество. Растежът и получаването на пашкулчета не следва да намалява в сравнение с червеите, отглеждани в субстрат, който не съдържа новата партида храна (условията са както е описано в метод за изпитване В.8 (4)).
33. Храната се дава първоначално един ден след въвежането на червеите и прилагането на изпитвания химикал към почвата. Приблизително 5 g храна се разпръсква по повърхността на почвата на всеки съд и се овлажнява с дейонизирана вода (около 5 ml до 6 ml на съд). След това храна се дава веднъж на седмица по време на 4-седмичния период на изпитване. Ако остане неконсумирана храна, дажбата следва да бъде намалена, за да се избегне развитието на гъбички или

▼ **M6**

плесен. Полово зрелите индивиди се отстраняват от почвата в ден 28 от изпитването. Допълнително се поставя 5 g храна във всеки съд за изпитване. През останалите 4 седмици от изпитването не се извършва допълнително хранене.

Избор на концентрации на изпитване

34. Предварителното познаване на токсичността на изпитвания химикал следва да помогне при избора на подходящи концентрации на изпитване, например от изпитване на остра токсичност (4) и/или от проучвания за определяне на обхвата. Когато е необходимо, се провежда изпитване за определяне на обхвата, например за пет концентрации на изпитване от 0,1, 1,0, 10, 100 и 1 000 mg/kg (суха маса на почвата). За всяка третирана и контролна проба е достатъчно едно повторение. Продължителността на изпитването за определяне на обхвата е две седмици и смъртността се оценява в края на изпитването.

План на проучването

35. Тъй като не може да бъде определена само една обобщена статистика за изпитването, настоящият метод за изпитване се отнася за определяне на NOEC и EC_x. Вероятно определянето на NOEC ще се изисква от регулаторните органи в обозримо бъдеще. В резултат от статистически и екологични съображения в близко бъдеще може да бъде възприето по-широко използване на EC_x. Следователно, въз основа на препоръките от кръгово изпитване на метод за размножаване на представители на сем. Enchytraeidae се предлагат три вида планове (17).
36. При определяне границите на концентрация се взема предвид следното:

- За определяне на NOEC следва да се изпитат най-малко пет/дванадесет концентрации в геометрична прогресия. Препоръчват се четири повторения за всяка концентрация за изпитване, плюс осем контроли. Концентрациите трябва да бъдат разделени една от друга с кратност, която не превишава 2,0.
- За определяне на EC_x (например EC₁₀, EC₅₀) се препоръчва брой концентрации, достатъчен за получаване най-малко на четири средни стойности на отклиците при тези концентрации със статистически значими различия между тях. Препоръчват се най-малко две повторения за всяка концентрация на изпитване и шест контролни повторения. Кратността на разделянето може да варира, т.е., да е по-малка или равна на 1,8 в диапазона на очакваното въздействие и над 1,8 при по-високите и по-ниските концентрации.
- Комбинираният подход, ако се използва такъв, дава възможност за едновременно определяне на NOEC и EC_x. Следва да бъдат използвани осем концентрации на третиране в геометрична прогресия. Препоръчват се четири повторения за всяко третиране, плюс осем контроли. Концентрациите трябва да бъдат разделени една от друга с кратност, която не превишава 1,8.

Продължителност на изпитването и измервания

37. В ден 28 оцелелите полови зрели червеи се наблюдават и преброяват. Всякакво необичайно поведение (напр. неспособност за копане в почвата; лежане неподвижно) и морфология (напр. открити рани) също се записват. След това всички полови зрели червеи се отстраняват от съдовете за изпитване, преброяват се и се претеглят. Прехвърлянето на почвата, съдържаща червеите, в чиста табла преди оценката може да улесни търсенето на полови зрели индивиди. Преди претегляне червеите, извлечени от почвата, следва да се измият (с дейонизирана вода) и излишната вода следва да се отстрани чрез поставяне на червеите за кратко време върху филтърна хартия. Всички червеи, които не са намерени по това време, трябва да бъдат записани като мъртви, тъй като следва да се допусне, че такива червеи са умрели и са се разградили преди оценката.

▼ **M6**

38. Ако почвата е отстранена от съдовете, след това тя се връща (без полови зрели червеи, но съдържаща всички получени пашкулчета). След това почвата се инкубира за още четири седмици при същите условия на изпитване, с изключение на това, че храненето се извършва само веднъж в началото на тази фаза на изпитването (вж. точка 33).
39. В края на втория 4-седмичния период се определят броят на излюпените от пашкулчетата ювенилни екземпляри в изпитваната почва и броят на пашкулчетата, като се използват процедурите, описани в допълнение 5. Всички признаци на увреждане или поражение по червеите трябва също да се записват по време на периода на изпитване.

Гранично изпитване

40. Ако при изпитването за определяне на обхвата не се наблюдава въздействие при най-високата концентрация (т.е., 1 000 mg/kg), изпитването за размножаването следва да бъде проведено като гранично изпитване, като се използва концентрация на изпитване от 1 000 mg/kg. Граничното изпитване ще предостави възможност да се демонстрира, че стойността на NOEC за размножаването е по-висока от пределната концентрация, едновременно с намаляване до минимум на броя червеи, използвани в изпитването. Както за третираната почва, така и за контролата следва да се използват по осем повторения

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Обработка на резултатите**

41. Въпреки че в допълнение 6 е направен общ преглед, в настоящия метод за изпитване не се дават окончателни насоки за статистически анализ на резултатите от изпитването.
42. Една от крайните точки е смъртността. Промените в поведението (напр. неспособност за копане в почвата; лежане неподвижно срещу съклената стена на съда за изпитване) и морфологията (напр. открити рани) на полови зрели индивиди следва обаче също да бъдат записвани, заедно с наличието на ювенилни екземпляри. Обичайно за определяне на LC_{50} следва да се прилагат пробит-анализ (18) или логистична регресия. Независимо от това в случаите, когато този метод за анализ е неподходящ (например, ако на разположение са по-малко от три концентрации с частично проявена смъртност), могат да се използват алтернативни методи. Тези методи могат да включват хлъзгачи средни (19), метод на Спирмън-Карбър с изключване на данни (20) или обикновена интерполация (напр. геометрична средна стойност на LC_0 и LC_{100} , изчислена чрез корен квадратен на LC_0 , умножена по LC_{100}).
43. Другата крайна точка е плодовитостта (т.е., броят на получените ювенилни индивиди). Независимо от това, също както и при изпитването за определяне на обхвата, всички други признаци за неблагоприятно въздействие трябва да бъдат записани в окончателния протокол. За изчисляване на размножаването статистическият анализ изисква средноаритметичната стойност \bar{x} и стандартното отклонение за всяко отделно третиране и за контролата.
44. Ако е направен дисперсионен анализ, стандартното отклонение s и степените на свобода (df) могат да бъдат заменени съответно от обединената оценка на дисперсията, получена от ANOVA, и от нейните степени на свобода, при условие че дисперсията не зависи от концентрацията. В такъв случай се използват единичните дисперсии на контролната и на третираните проби. Тези стойности обикновено се изчисляват с търговски статистически софтуер, с използване на резултатите по съдове като повторения. Ако обединяването на данни за негативните контроли и контролите на разтворител изглежда по-разумно, отколкото изпитването само на една от тях, те трябва да бъдат тествани дали не са значимо различни (за подходящия тест се вземат предвид точка 47 и допълнение 6).
45. Допълнителното статистическо тестване и статистическите изводи и заключения зависят от това дали стойностите на повторенията са нормално разпределени и са с хомогенна дисперсия.

▼ M6

Оценка на NOEC

46. Следва да се предпочита прилагането на мощни тестове. За това дали данните са приблизително нормално разпределени, следва да се използва информация, например от предходен опит с кръгови изпитвания или от други данни за предходни периоди. Хомогенността на дисперсията (хомоскедастичността) е по-важна. Опитът показва, че дисперсията често се увеличава с увеличаването на средната стойност. В тези случаи преобразуване на данните би могло да доведе до хомоскедастичност. Такава трансформация обаче следва да се основава на опита, натрупан с данните за предходни периоди, вместо на данните, които са предмет на проучването. При хомогенни данни следва да се използват множествени t-тестове като тестът на Уйлямс ($\alpha = 0,05$, едностранен) (21) (22) или, в някои случаи, тестът на Дънет (23) (24). Следва да се отбележи, че в случай на неравни повторения табличните t-стойности трябва да се коригират както се предлага от Дънет и Уйлямс. В някои случаи, поради наличието на големи колебания, откликите не се увеличават/намаляват регулярно. В този случай на голямо отклонение от монотонността тестът на Дънет е по-подходящ. Ако са налице отклонения от хомоскедастичността, може да е уместно да се проучат по-детайлно възможните въздействия върху дисперсията, за да се вземе решение дали могат да бъдат прилагани t-тестове без да се губи много мощност (25). Множествен U-тест като например U-тестът на Бонферони по Holm (26) или — когато тези данни показват хетероскедастичност, но иначе са съобразени с базисната монотонна зависимост доза-отклик — друг непараметричен тест (напр. на Йонкхере-Терпстра (27) (28) или на Шърли (29) (30)) могат да бъдат прилагани като алтернатива и като цяло се предпочитат пред t-тестовете при неравна дисперсия. (виж също и схемата в допълнение 6).
47. Ако е извършено гранично изпитване и критериите за използване на параметрични тестови процедури (нормалност, хомогенност) са изпълнени, може да се използва t-тестът на Стюдънт за сравнения по двойки, или в противен случай — процедурата на U-теста на Ман-Уитни (31).

Оценка на ЕС_x

48. За да се изчисли стойността на ЕС_x, средните стойности от всяко третиране се използват за извършване на регресионен анализ (линеен или нелинеен), след като е получена подходяща функция доза-отклик. За растежа на червеите като непрекъснат отклик стойностите на ЕС_x могат да се оценят с използване на подходящ регресионен анализ (32). Сред подходящите функции за двоични данни (смъртност/преживяване) и брой на полученото потомство са обикновената сигмоидна, логистичната функция или функцията на Вейбул, с два до четири параметъра, някои от които могат също така да моделират хорметични отклици. Ако функция доза-отклик е била изгладена с линеен регресионен анализ, при този анализ трябва да е получен значим r^2 (коефициент на детерминация) и/или наклон преди изчисляване на ЕС_x чрез добавяне на стойност, съответстваща на x % от средната стойност на контролна проба, в полученото чрез регресионен анализ уравнение. 95 %-ните доверителни граници се изчисляват по Fieller (цитиран във Finney (18)) или с други подходящи съвременни методи.
49. Като алтернативна възможност откликът се моделира като процент или пропорция от параметър на модел, който се тълкува като средна стойност на отклика на контролната проба. В тези случаи нормалната (логистична, на Вейбул) сигмоидна крива може често да бъде лесно изгладена по отношение на резултатите, като се използва пробит-регресия (18). В тези случаи функцията на претеглянето трябва да бъде коригирана за метрични отклици, както е по Christensen (33). Ако обаче се наблюдава хормезис, пробит-анализът следва да бъде заменен с логистична функция или функция на Вейбул с четири параметъра, изгладена с помощта на нелинейна регресия (34). Ако подходяща функция доза-отклик функция не може да се съгласува с данните, може да се използват алтернативни методи за оценяване на ЕС_x и нейните доверителни граници, като хлъзгачи средни по Томпсън (19) и метод на Спирмън-Карбър с изключване на данни (20).

ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

50. Протоколът от изпитването трябва да съдържа следната информация:

▼ **M6***Изпитван химикал:*

- окончателно описание на изпитвания химикал, партида, пратка и номер по CAS, чистота;
- свойства на изпитвания химикал (напр. $\log K_{ow}$, разтворимост във вода, парно налягане, константа на Хенри (H) и информация за съдбата и поведението в околната среда).

Изпитвани организми:

- използвани в изпитването животни: вид, научно наименование, източник на организмите и условия на отглеждане;
- възраст, диапазон от размери (маси) на изпитваните организми.

Условия на изпитването

- подробни данни за почвата за изпитване;
- максималната способност на почвата за задържане на вода;
- описание на техниката, използвана за прилагане на изпитвания химикал към почвата;
- подробни данни за спомагателните химикали, използвани за прилагането на изпитвания химикал;
- подробни данни за калибриране на оборудването за пръскане, ако е приложимо;
- описание на плана на проучването и на процедурата;
- размер на съдовете за изпитване и обема на почвата за изпитване;
- условия на изпитване: интензитет на светлината, продължителност на циклите светлина-тъмнина, температура;
- описание на режима на хранене, вида и количество на храната, използвана при изпитването, дати на хранене;
- стойност на рН и съдържание на вода в почвата в началото и в края на изпитването.

Резултати от изпитването:

- смъртност при полово зрелите индивиди (%) във всеки съд за изпитване в края на първите 4 седмици от изпитването;
- общата маса на полово зрелите индивиди в началото на изпитването във всеки от съдовете за изпитване;
- промени в телесното тегло на живите полово зрели индивиди (% от първоначалното тегло) за всеки от съдовете за изпитване след първите четири седмици на изпитването;
- броят на ювенилните екземпляри, получени във всеки от съдовете за изпитване в края на изпитването;
- описание на видими или патологични симптоми, или явни промени в поведението;
- резултатите, получени с референтния изпитван химикал;
- стойностите на LC_{50} , $NOEC$ и/или EC_x (напр. EC_{50} , EC_{10}) за размножаването, ако някои от тях са приложими с доверителни интервали, и графика на изгладения модел, използвана за изчисляването им, цялата информация и полезни наблюдения за тълкуване на резултатите;
- графичното изобразяване на зависимостта доза-отклик;
- резултатите, приложими за всеки съд за изпитване;

отклонения от процедурите, описани в настоящия метод за изпитване, и всички необичайни обстоятелства по време на изпитването.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Jaenicke, J. (1982). „*Eisenia foetida*“ is two biological species. *Megadriologica* 4, 6-8.
- (2) Oien, N. and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm — III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. *Comp. Biochem. Physiol.* 78c (2), 277 — 282.

▼ M6

- (3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* — comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.
- (4) Глава В.8 от настоящото приложение „Токсичност за земни червеи“
- (5) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.
- (6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneve.
- (7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.
- (8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.
- (9) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.
- (10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.
- (11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.
- (12) Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.
- (13) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.
- (14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (15) ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality —Determination of water retention characteristics —Laboratory methods, No. 11274. ISO, Geneve.
- (16) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality —Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.
- (17) Römbke, J. and Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.

▼ **M6**

- (18) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis* (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (19) Finney, D.J. (1978). *Statistical Method in Biological Assay*. — Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (20) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; Correction *Environ. Sci. Technol.* 12(1998), 417.
- (21) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, 103-117.
- (22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, 519-531.
- (23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- (24) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20, 482-491.
- (25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? *Ecotoxicology* 7: 355-361
- (26) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- (27) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, *Biometrika* 41, 133-145.
- (28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, *Indagationes Math.* 14, 327-333.
- (29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, *Applied Statistics* 28, 144-151.
- (30) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, *Biometrics* 42, 183-186.
- (31) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). *Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research*. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- (32) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:1485-1494
- (33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18, 213-221.
- (34) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. *Ecotox, Environ. Safety.* 25, 25-32.

▼ **M6***Допълнение 1***Определения**

В настоящия метод за изпитване са приложими следните определения:

Химикал означава вещество или смес.

EC_x (ефективна концентрация, при която се наблюдава x % от въздействието) е концентрацията, която причинява x % от дадено въздействие на изпитвани организми в рамките на даден период на експозиция, при сравнение с контрола. Например EC₅₀ е концентрация, за която е направена оценка, че предизвиква дадено въздействие върху изпитвана крайна точка в 50 % от експонираната популация в рамките на определен период на експозиция. В настоящото изпитване ефективните концентрации се изразяват като масата на изпитвания химикал към сухата маса на почвата за изпитване или като масата на изпитвания химикал към единица площ на почвата.

LC₀ (нелетална концентрация) е концентрацията на изпитвания химикал, която не води до летален изход при никой от експонираните изпитвани организми в рамките на даден период от време. В настоящото изпитване LC₀ се изразява като масата на изпитвания химикал към сухата маса на почвата за изпитване.

LC₅₀ (медианна летална концентрация) е концентрацията на изпитвания химикал, която води до летален изход при 50 % от експонираните изпитвани организми в рамките на даден период от време. В настоящото изпитване LC₅₀ се изразява като масата на изпитвания химикал към сухата маса на почвата за изпитване или като масата на изпитвания химикал към единица площ на почвата.

LC₁₀₀ (напълно летална концентрация) е концентрацията на изпитвания химикал, която води до летален изход при 100 % от експонираните изпитвани организми в рамките на даден период от време. В настоящото изпитване LC₁₀₀ се изразява като масата на изпитвания химикал към сухата маса на почвата за изпитване.

LOEC (най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект) е най-ниската концентрация на изпитвания химикал, при която е наблюдавано статистически значимо въздействие ($p < 0,05$). В настоящото изпитване LOEC се изразява като масата на изпитвания химикал към сухата маса на почвата за изпитване или като масата на изпитвания химикал към единица площ на почвата. Всички концентрации на изпитване, по-големи от LOEC, следва по принцип да показват въздействие, което в статистическо отношение е различно от това на контролата. Всички отклонения от посоченото по-горе по отношение трябва да бъдат обосновани в протокола от изпитването.

NOEC (концентрация без наблюдавано въздействие) е най-високата концентрация на изпитвания химикал непосредствено под LOEC, при която не се наблюдава въздействие. В настоящото изпитване концентрацията, съответстваща на NOEC, няма статистически значимо ($p < 0,05$) въздействие в рамките на даден период на експозиция, при сравнение с контролата.

Скорост на размножаването: средният брой ювенилни червеи, получени от определен брой полово зрели индивиди за времето на изпитването.

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

▼ **M6***Допълнение 2***Определяне на максималната способност на почвата за задържане на вода**

За подходящ се смята следният метод за определяне на максималната способност на почвата за задържане на вода. Той е описан в приложение С към стандарта ISO DIS 11268-2 (1).

Взема се определено количество (например 5 g) изпитван почвен субстрат с помощта на подходящо устройство за пробовземане (шнекова сонда и т.н.). Дъното на сондата се покрива с парче филтърна хартия, сондата се напълва с вода и след това се поставя на стойка на водна баня. Сондата следва постепенно да се потапя във водата, докато нивото на водата стане над повърхността на почвата. След това тя се оставя във водата за около три часа. Тъй като не цялото количество вода, абсорбирано от почвените капиляри, може да бъде задържано, почвената проба следва да се остави да се отцеди в продължение на два часа чрез поставяне на сондата върху легло от много влажен фино смлян кварцов пясък, намиращо се в покрит съд (за да се предотврати изсушаването). Тази проба следва след това да бъде претеглена и изсушена до постоянна маса при температура 105 °C. Способността за задържане на вода (СЗВ) може след това да се изчисли, както следва:

$$\text{СЗВ(в \% от сухата маса)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

където:

S = водонаситен субстрат + маса на сондата + маса на филтърната хартия

T = тара (маса на сондата + маса на филтърната хартия)

D = сухата маса на субстрата

ПОЗОВАВАНИЯ:

- (1) ISO (International Organization for Standardisation) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneva.

▼ M6*Допълнение 3***Определяне на стойността на рН на почвата**

Описаният по-долу метод за определяне на рН на почвата се основава на описанието в ISO DIS 10390: Качество на почвите — Определяне на рН (1).

Определено количество почва се изсушава при стайна температура в продължение на най-малко 12 часа. След това се приготвя суспензия от почвата, (съдържаща най-малко 5 грама почва) в нейния петкратен обем или в 1 М разтвор на калиев хлорид (KCl) с квалификация „чист“, или в 0,01 М разтвор на калциев хлорид (CaCl₂) с квалификация „чист“. След това суспензията се разклаща добре в продължение на пет минути и се оставя да се утаи в продължение на най-малко 2 часа, но не повече от 24 часа. След това се измерва стойността на рН на течната фаза с помощта на рН-метър, който е бил калибриран преди всяко измерване чрез подходящ набор от буферни разтвори (напр. рН 4,0 и 7,0).

ПОЗОВАВАНИЯ:

- (1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneva.

▼ **M6**

Допълнение 4

Отглеждане на *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*

Предпочита се отглеждането да се извършва в климатична камера при 20 °C ± 2 °C. При тази температура и при осигуряването на достатъчно храна, червеите достигат полова зрялост след около 2 до 3 месеца.

И двата вида могат да бъдат отглеждани върху най-различни животински отпадъци. Препоръчаната среда за отглеждане е смес 50:50 от конски или говежди тор и торф. Трябва да се извършват проверки, за да се гарантира, че кравите или конете, от които се получава оборски тор, не са подложени на лекарствена терапия или лечение с химикали като стимулатори на растежа, нематоциди или подобни ветеринарни продукти, които биха могли да се отразят неблагоприятно на червеите по време на изпитването. Препоръчва се събиран самостоятелно органичен тор, тъй като опитът показва, че наличният в търговската мрежа тор, използван за наторяване на градини, може да има неблагоприятно въздействие върху червеите. Средата трябва да има стойност на рН от около 6 до 7 (коригирана с калциев карбонат) и ниска йонна проводимост (под 6 mS/cm или концентрация на соли от 0,5 %) и не бива да е прекомерно замърсена с амоняк или животинска урина. 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 размери (маса), най-добре е отглеждането да се започне от пашкули. След въвеждането на културата тя се поддържа чрез поставяне на полово зрели червеи в кутия за размножаване с пресен субстрат за период от 14 дни до 28 дни, за да се даде възможност за получаване на допълнителни пашкули. След това полово зрелите индивиди се отстраняват и излюпените от пашкулите ювенилни индивиди се използват като основа за следващата култура. Червеите се захранват непрекъснато с животински отпадъци и от време на време се прехвърлят в пресен субстрат. Опитът показва, че изсушеният на въздух фино смлян говежди или конски тор, както и овесеното брашно, са подходяща храна. Трябва да се гарантира, че кравите или конете, от които се получава оборският тор, не са подложени на лекарствена терапия с химикали, като например стимулатори на растежа, които биха могли да се отразят неблагоприятно на червеите при продължително отглеждане. Излюпените от пашкулите червеи се използват за изпитване, когато са на възраст между 2 и 12 месеца и които се считат за полово зрели.

Червеите могат да се смятат за здрави, ако се движат в субстрата, не се опитват да го напускат и се размножават непрекъснато. При червеите много бавното движение и жълтият заден край са указание за изтощаване на субстрата. В този случай се препоръчва предоставяне на свеж субстрат и/или намаляване на гъстотата на отглеждане.

▼ **M6***Допълнение 5***Техники за броене на излюпени от пашкули ювенилни червеи**

Ръчното сортиране на червеите от почвения субстрат отнема много време. Във връзка с това се препоръчват два алтернативни метода:

- а) съдовете за изпитване се поставят на водна баня при първоначална температура 40 °С, която се увеличава до 60 °С. След период от около 20 минути ювенилните червеи следва да се появят на повърхността на почвата, откъдето те лесно да могат да бъдат отстранени и преброени.
- б) използваната при изпитването почва може да се промие през сито, като се използва методът, разработен от van Gestel et al. (1), при условие че торфът и оборският тор или овесеното брашно, добавени към почвата, са били стрити на фин прах. Две сита (с диаметър 30 cm) с размер на отвора 0,5 mm се поставят едно върху друго. Съдържанието на даден съд за изпитване се промива през ситата със силна струя чешмяна вода, при което новородените червеи и пашкулите се задържат главно върху горното сито. Важно е да се отбележи, че цялата повърхност на горното сито следва да се запази влажна по време на тази операция, така че ювенилните червеи да плават върху слой от вода, което по този начин ги възпрепятства да преминават през порите на ситото. Най-добри резултати се постигат, когато се използва глава за душ.

След като целият почвен субстрат е промит през ситото, ювенилните екземпляри и пашкулите могат да бъдат отмити от горното сито в купа. Съдържанието на купата след това се оставя да престои, което дава възможност празните пашкули да останат да плуват на водната повърхност, а пълните пашкули и новородените червеи — да потънат на дъното. След това престоялата вода може да се излее и новородените червеи и пашкулите да се прехвърлят в блюдо на Петри, съдържащо малко вода. Червеите могат да се отстранят за преброяване, като за целта се използва игла или пинсета.

Опитът показва, че метод а) е по-подходящ за извличане на ювенилни червеи, които могат да бъдат отмити дори и през сито с око 0,5 mm.

Ефикасността на метода, използван за отстраняване на червеите (и на пашкулите, ако е целесъобразно) от почвения субстрат, следва винаги да бъде определяна. Ако ювенилните индивиди са събрани чрез използване на ръчно сортиране, препоръчително е операцията да се извърши два пъти за всички проби.

ПОЗОВАВАНИЯ:

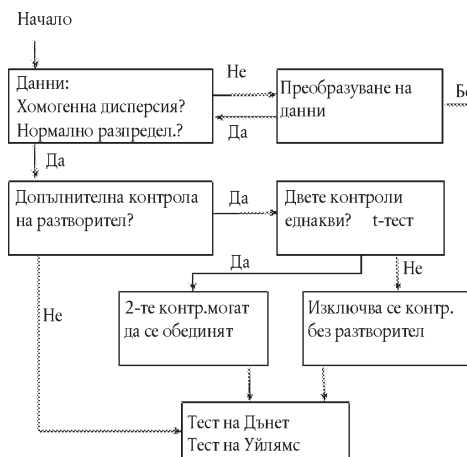
- (1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32:367-371.

▼ M6

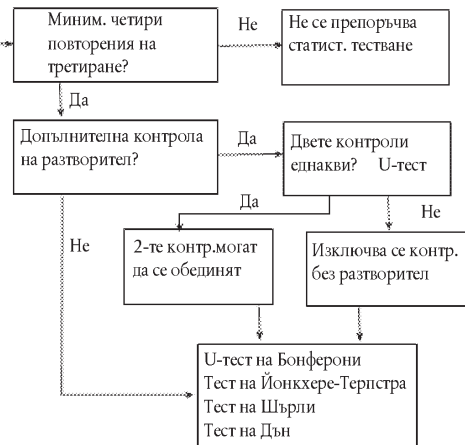
Допълнение 6

Преглед на статистическата оценка на данните (Определяне на NOEC)

Параметрични тестове



Непараметрични тестове



▼ M6

В.34. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ИНХИБИРАНЕТО НА АКТИВНОСТТА НА АНАЕРОБНИ БАКТЕРИИ — НАМАЛЯВАНЕ НА ПРОИЗВОДСТВОТО НА ГАЗ ОТ АНАЕРОБНО РАЗГРАЖДАЩИ СЕ (ОТПАДЪЧНИ) УТАЙКИ

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСР (TG) 224 (2007). Химикалите, зауствани във водна среда, преминават както през аеробни, така и през анаеробни зони, където те могат да се подложат на разграждане и/или могат да потиснат бактериалната активност; в някои случаи те могат да останат без външно въздействие в анаеробните зони в продължение на десетилетия или повече. При пречистването на отпадъчни води първата фаза, първичното утаяване, е аеробна в супернатантната течност, докато в намиращата се под течността утайка са налице анаеробни условия. Във втората фаза следват аеробна зона в резервоара за аериране с активна утайка и анаеробна зона в намиращата се под течността утайка в резервоара за вторично утаяване. Утайката от тези две фази обикновено се подлага на анаеробна обработка, в резултат от която се отделят метан и въглероден диоксид, които обикновено се използват за производството на електроенергия. В по-широк план в околната среда химикалите, достигащи до утайки в заливи, устия и морето вероятно ще останат в анаеробните зони за неограничен период от време, ако не са биоразградими. Физически свойства, като например малка разтворимост във вода, висока адсорбция към суспендирани твърди вещества, както и невъзможност за биоразграждане в аеробна среда, биха позволили на по-голям дял от някои химикали да достигнат до тези зони.
2. Въпреки че е желателно химикалите, изпускани в околната среда, да са биоразградими както при аеробни, така и при анаеробни условия, важно е тези химикали да не потискат активността на микроорганизмите в никоя от зоните. В Обединеното кралство имаше няколко случая на цялостно потискане на получаването на метан, причинено, например, от пентахлорофенол в промишлени отпадъци, водещо до много скъпо транспортиране на инхибираните утайки от реакторите към „безопасни“ площадки и подаване на прясна разграждаща се утайка от съседни съоръжения. Но има и много случаи на не толкова сериозно прекъсване на разграждането от няколко други химикала, включително алифатни халогенирани въглеводороди (химическо чистене) и детергенти, довело до значително влошаване на ефикасността на разграждането.
3. Само един метод за изпитване, В.11 (1), се занимава с потискането на бактериалната активност (Дишане на активна утайка), като с него се прави оценка на въздействието на изпитвани химикали върху скоростта на усвояването на кислород в присъствието на субстрат. Методът се използва широко за даване на ранно предупреждение за възможното вредно въздействие на химикалите върху аеробното пречистване на отпадъчните води, както и за посочване на концентрации на изпитваните химикали, които не водят до потискане, и които да се използват при различните изпитвания за биоразградимост. Метод за изпитване В.43 (2) дава ограничена възможност за определяне доколко даден изпитван химикал е токсичен за производство на газ от утайката в анаеробни условия, разрежена до една десета от нормалната за нея концентрация на твърди вещества, за постигане на изискваната прецизност при оценката на процента на биоразграждане. Тъй като разредената утайка може да е почувствителна към потискащи химикали, групата по ISO реши да изготви метод чрез използване на неразредена утайка. Бяха разгледани най-малко три текста (от Дания, Германия и Обединеното кралство) и накрая бяха изготвени два ISO стандарта, единият от които с използване на неразредена утайка, ISO 13 641-1 (3), а другият — с използване на разрежена до една стотна утайка, ISO 13 641-2 (4), за представяване на кал и утайки, имащи малки бактериални популации. И двата метода бяха подложени на кръгово изпитване (5); част 1 беше потвърдена като приемлив стандарт, но не беше постигнато съгласие по част 2. Органите на Обединеното кралство счетоха, че тъй като значителен дял от участниците посочват твърде слабо или никакво получаване на газ, отчасти защото делът на пространството на газа е бил твърде висок (75 %) за оптимална чувствителност, методът изисква допълнително разглеждане.
4. В по-ранни разработки в Обединеното кралство (6)(7) е описан манометричен метод чрез използване на неразредена разграждаща утайка плюс сурова утайка от отпадъчни води като субстрат, в колби от 500 ml; апаратурата е била е неудобна и миризмата на суровата утайка е била

▼ M6

неприятна. По-късно от Wilson et al. (10) е била приложена успешно по-компактната и удобна апаратура на Shelton and Tiedje (8), разработена от Battersby and Wilson (9). Kawahara et al (11) успешно са приготвили по-стандартни утайки в лабораторни условия за използване при изпитвания за анаеробна биоразградимост и потискане за редица химикали. Също така, за извършване на изпитване суровата утайка като субстрат е заменена с разредена до една стотна анаеробна утайка, или с кал, утайки и т.н. с ниска бактериална активност.

5. Този метод може да предостави информация, която е полезна при прогнозирането на вероятните въздействия на даден изпитван химикал върху получаването на газ в анаеробни реактори. Независимо от това единствено по-дълги изпитвания, симулиращи по-добре реактори в работни условия, могат да покажат дали може да настъпи адаптиране на микроорганизмите към изпитвания химикал или дали химикалите, за които е вероятно да бъдат абсорбирани и адсорбирани от утайката, могат да се натрупат до токсични концентрации за период, по-дълъг от предвидения в настоящото изпитване.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

6. Аликвотни части от смес на анаеробно разграждащи се утайки (20 g/l — 40 g/l общо съдържание на твърди вещества) и разтвор на разградим субстрат се инкубират поотделно и едновременно с концентрации на изпитвания химикал в определен диапазон в херметично затворени съдове за период до 3 дни. Полученото количество газ (метан и въглероден диоксид) се измерва посредством увеличаването на налягането (Pa) в бутилките. Процентното потискане на получаването на газ, предизвикано при различните концентрации на изпитвания химикал, се изчислява от стойностите, получени при съответните изпитвани и контролни бутилки. Стойностите на EC₅₀ и други ефективни концентрации се изчисляват от графиките на процентното потискане спрямо концентрацията на изпитваните химикали, или, по-често — от нейния логаритъм.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНИЯ ХИМИКАЛ

7. Изпитваните химикали следва да се използват по принцип в най-чистата форма, която е лесно достъпна, тъй като онечистванията в някои химикали, например хлорофеноли, могат да бъдат значително по-токсични от самия изпитван химикал. Независимо от това следва да бъдат взети предвид потребностите от изпитваните химикали във вида, в който са произведени/пуснати в търговската мрежа. Използването на формулирани продукти обикновено не се препоръчва, но при малко разтворими изпитвани химикали използването на формулирани материали може да бъде подходящо. Свойствата на изпитвания химикал, за които следва да има налична информация, включват разтворимост във вода и някои органични разтворители, парно налягане, коефициент на адсорбция, хидролиза и биоразградимост в анаеробни условия.

ПРИЛОЖИМОСТ НА МЕТОДА

8. Изпитването се прилага за химикали, които са разтворими или неразтворими във вода, включително летливи химикали. Необходимо е обаче специално внимание при силно летливите материали с малка разтворимост във вода (виж позоваване (12)). Също така може да бъде използван инокулум от други анаеробни обекти, напр. кал, наситени почви, утайки. Анаеробните бактериални системи, които по-рано са били експонирани на токсични химикали, могат да бъдат адаптирани да поддържат активността си в присъствието на ксенобиотични химикали. Инокулумът от адаптирани бактериални системи може да има по-голяма толерантност към изпитваните химикали в сравнение с инокулума, получен от неадаптирани системи.

РЕФЕРЕНТНИ ХИМИКАЛИ

9. За да се провери процедурата, се изпитва референтен химикал чрез паралелно приготвяне на подходящи съдове като част от нормалните провеждания на изпитването; за 3,5-дихлорофенол е доказано, че е последователен инхибитор на анаеробното получаване на газ, както и на потреблението на кислород от активната утайка и на други биохимични реакции. За два други химикала е показано, че са силни инхибитори на получаването на метан от 3,5-дихлорофенола, а именно метиленибистиоцианат и пентахлорофенол, но резултатите при тях не са били валидирани. Пентахлорофенолът не се препоръчва, тъй като не е лесно достъпен в чист вид.

▼ **M6**

ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

10. При международно кръгово изпитване за 3,5-дихлорофенол и 2-бромоетансулфонова киселина (5) е получена само задоволителна възпроизводимост в стойностите на EC_{50} между 10-те участващи лаборатории. (диапазонът за първия е бил от 32 mg/l до 502 mg/l, а за втория — от 220 mg/l до 2 190 mg/l).

Брой на лабораториите	като mg/l			като mg/g утайка		
	средно	s.d.	cv(%)	средно	s.d.	cv(%)
	3,5-дихлорофенол					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-бромоетансулфонова киселина					
10	1 058	896	85	34	26	76

данни за EC_{50} от кръговото изпитване — неразредена утайка

11. Високите коефициенти на вариация между лабораториите до голяма степен отразяват разликите в чувствителността на микроорганизмите в утайката или поради предварителна експозиция, или поради липсата на предварителна експозиция на изпитвания химикал или на други химикали, които са химически свързани с него. Прецизността, с която е била определена стойността на EC_{50} , основана на утайката, е била съвсем малко по-добра от „волуметричната“ стойност (mg/l). Трите лаборатории, които са протоколирали за прецизността на стойностите си за EC_{50} за 3,5-дихлорофенол, са показали много по-ниски коефициенти на вариация (22,9 и 18 % съответно за EC_{50} mg/g) от тези на средните за всички десет лаборатории. Индивидуалните средни за трите лаборатории са били съответно 3,1, 3,2 и 2,8 mg/g. По-ниските, допустимите вътрешнолабораторни коефициенти на вариация, в сравнение с много по-високите стойности на междулабораторните коефициенти, а именно срв. 9-22 % с 92 %, показват, че съществуват значими разлики в свойствата на отделните утайки.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Апаратура

12. Изисква се използване на стандартно лабораторно оборудване, както и на следното:
- Инкубатор — безискров и контролиран при $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$;
 - Устойчиви на налягане стъклени съдове за изпитване с подходящ номинален размер ⁽¹⁾, всеки от които е снабден с газонепроницаема промазана септа, способна да издържи около 2 bar или 2×10^5 Pa (за промазване се използва напр. политетрафлуороетен = PTFE). Препоръчват се стъклени серумни бутилки с номинален обем 125 ml, с действителен обем от около 160 ml, херметично затворени със септи за серумни бутилки ⁽²⁾ и алуминиеви капачки във формата на пръстени; могат обаче да се използват успешно бутилки с общ обем между 0,1 и 1 литър;

⁽¹⁾ Препоръчителният обем е от 0,1 до 1 литър.

⁽²⁾ Препоръчва се употребата на газонепроницаеми силиконови септи. Освен това се препоръчва изпитване на херметичността на септите, особено направените от бутилов каучук, тъй като няколко от наличните в търговската мрежа не са достатъчно газонепроницаеми срещу метан, а някои септи не остават плътно прилепени след пробиване с игла при условията на изпитването.

— Септите с газонепроницаемо покритие се препоръчват и трябва да се използват за летливи химикали (някои от наличните в търговската мрежа септи са сравнително тънки, по-малко от 0,5 cm, и не запазват газонепроницаемостта си след пробиване с игла от спринцовка);

— Септите от бутилов каучук (около 1 cm) се препоръчват, ако изпитваните вещества не са летливи (обикновено те запазват газонепроницаемостта си след пробиване).

— Преди изпитването се препоръчва внимателно изследване на способността на септите да запазват газонепроницаемостта си след пробиване.

▼ **M6**

- в) Прецизен манометър ⁽¹⁾ с приложена игла

Общото количество получени газове (метан и въглероден диоксид) се измерва с помощта на манометър, приспособен за измерване и пропускане на получените газове. Пример за подходящ инструмент е ръчният прецизен манометър, свързан с игла от спринцовка; трипътен газонепроницаем клапан позволява изпускане на надналягането (допълнение 1). Необходимо е вътрешният обем в тръбите на преобразувателя на налягането и клапана да се запази колкото е възможно по-малък, така че грешките от пренебрегването на обема на оборудването да не са значими;

- г) изолирани съдове, за транспорт на разграждащата се утайка;
- д) трипътни изпускателни клапани;
- е) сито с квадратни отвори със страна 1 mm;
- ж) резервоар за разграждащата се утайка, бутилка от стъкло или полиетилен висока плътност, с вместимост около 5 l, снабдена с бъркалка и приспособления за преминаване на поток от азот (вж. точка 13) през парното пространство;
- з) мембранни филтри (0,2 µm) за стерилизиране на субстрата;
- и) микроспринцовки, за газонепроницаемо свързване на преобразувателя на налягането (вж. точка 12 в)) към парното пространство в бутилките (вж. точка 12 б)); също и за добавяне в бутилките на неразтворими течни изпитвани материали;
- й) защитна камера с ръкавици, с леко положително налягане на азота (незадължителна, но препоръчителна характеристика).

Реактиви

13. Навсякъде се използват само реактиви с квалификация „чист“⁴. Навсякъде следва да се използва газообразен азот с висока чистота, със съдържание на кислород по-малко от 5µl/l.

Вода

14. При необходимост от разреждане на някакъв етап, се използва дейонизирана вода, от която въздухът е предварително отстранен. Не е необходим аналитичен контрол на тази вода, но следва да се гарантира, че апаратът за дейонизиране се поддържа редовно. Дейонизирана вода се използва също така за приготвянето на изходните разтвори. Преди добавянето на анаеробния инокулум към някой от разтворите или разредените разтвори на изпитван материал, следва да се гарантира, че същите не съдържат кислород. Това се постига или чрез продухване на азот чрез водата за разреждане (или чрез разредените разтвори) в продължение на 1 час преди добавянето на инокулума или, като алтернативен вариант, чрез нагряване на водата за разреждане до кипене и охлаждане до стайна температура в безкислородна среда.

Разградена утайка

15. Взема се активно разграждаща се утайка от реактор в пречиствателна станция за отпадъчни води или, като алтернатива, от лабораторен реактор, третиращ утайки предимно от битови отпадъчни води. Практическа информация относно утайките от лабораторни реактори може да бъде намерена в друг източник (11). Ако съществува намерение за използване на адаптиран инокулум, може да бъде взета под внимание разграждаща се утайка от станция за пречистване на промишлени

⁽¹⁾ Измервателният уред трябва да се използва и калибрира на редовни интервали от време в съответствие с инструкциите на производителя. Ако се използва манометър с предписаното качество, напр. капсулиран със стоманена мембрана, не е необходимо калибриране в лабораторията. Той трябва да бъде калибриран от лицензиран институт на препоръчителните интервали от време. Точността на калибрирането може да бъде проверена в лабораторията с едноточково измерване при 1×10^3 Pa спрямо манометър с механичен дисплей. Ако тази точка е измерена правилно, линейността също ще бъде непроменена. При използване на други измервателни устройства (без сертифицирано калибриране от производителя) се препоръчва преобразуване за целия диапазон на редовни интервали (допълнение 2).

▼ M6

отпадъчни води. За вземане на утайката се използват бутилки с широко гърло, изработени от полиетилен висока плътност или подобен материал, с възможност за разширяване. Утайката се добавя в бутилките за проби до около 1 cm от върха на бутилката, бутилките се запечатат плътно, за предпочитане с предпазен клапан (точка 12, д)), и се поставят в изолирани съдове (точка 12, г)) с цел свеждане до минимум на температурния шок, до прехвърлянето им в инкубатор, в който се поддържа температура $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. При отварянето на бутилки се вземат мерки за освобождаване на газовото надналягане или чрез внимателно разхлабване на херметичното затваряне, или чрез трипътния изпускателен клапан (точка 12, д)). Препоръчва се използването на утайката в рамките на няколко часа след нейното вземане, в противен случай тя се съхранява до 3 дни при $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ с парно пространство от азот, когато обичайно загубата на активност е малка.

Предупреждение — от разграждащата се утайка се получават запалими газове, които създават рискове от пожар и експлозия; тя също така съдържа потенциално патогенни организми и следователно при работата с утайката трябва да се вземат подходящи предпазни мерки. Поради причини, свързани с безопасността, за вземане на утайката не се използват стъклени съдове.

Инокулум

16. Непосредствено преди употреба утайката се размесва чрез леко разбъркване и се пропуска през сито с размер на отворите 1 mm^2 (точка 12, е)) в подходяща бутилка (точка 12, ж)) през парното пространство на която се пропуска поток от азот. Заделя се проба за измерване на концентрацията на общото количество сухо вещество (вж. например ISO 11923 (13) или еквивалентен стандарт на ЕС). По принцип се използване утайка без разреждане. Концентрацията на твърди вещества обикновено е между 2 % и 4 % (w/v). Определя се стойността на рН и, ако е необходимо, се коригира до $7 \pm 0,5$.

Субстрат за изпитването

17. Разтварят се 10 g хранителен бульон (напр. Oxoid), 10 g екстракт от дрожди и 10 g D-глюкоза, в дейонизирана вода и се разреждат до 100 ml. Пробата се стерилизира чрез филтруване през мембранен филтър с $0,2\text{ }\mu\text{m}$ (точка 12, з)) и се използва незабавно, или се съхранява не повече от 1 ден при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Изпитван химикал

18. Приготвя се отделен изходен разтвор за всеки от разтворимите във вода изпитвани химикали, съдържащ примерно 10 g/l от химикала във вода за разреждане без съдържание на кислород (точка 14). За приготвяне на реакционните смеси, съдържащи различните концентрации, се използват подходящи обеми от тези изходни разтвори. Като алтернатива, от всеки изходен разтвор се изготвя серия от разредени разтвори, така че обемът, добавен в бутилките за изпитването, да е един и същ за всяка изисквана крайна концентрация. Стойностите на рН на изходните разтвори трябва да се коригират до $7 \pm 0,2$, ако е необходимо.
19. За изпитвани химикали, които не са достатъчно разтворими във вода, вж. ISO 10634 (12) или еквивалентен стандарт на ЕС. Ако е необходимо използването на органичен разтворител, се избягват разтворители като хлороформ и тетрахлометан, за които е известно, че значително потискат получаването на метан. Приготвя се разтвор с подходяща концентрация на неразтворимия във вода химикал в подходящ летлив разтворител, като например ацетон, диетилов етер. Добавят се необходимите обеми от разтвор с разтворител в празни бутилки за изпитване (точка 12, б)) и разтворителят се изпарява преди добавянето на утайка. За други видове третиране се ползва стандарт ISO 10634 (12) или еквивалентен стандарт на ЕС, но следва да се има предвид, че всички повърхностноактивни вещества, използвани за получаване на емулсии, могат да имат потискащо въздействие върху получаването на газ в анаеробни условия. Ако се смята, че наличието на органични разтворители, емулгатори причинява артефакти, изпитваният химикал може да бъде добавен направо в изпитвателната смес като прах или течност. Летливи химикали и неразтворими във вода течни изпитвани химикали могат да бъдат инжектирани в инокулирани серумни бутилки, с използване на микросприцовки (точка 12, и)).

▼ **M6**

20. В бутилките се добавят изпитвани химикали до получаване на геометрична прогресия от концентрации, например 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l и 15,6 mg/l. Ако диапазонът на токсичността не е известен от сходни химикали, най-напред се извършва предварително изпитване за определяне на обхвата с концентрации от 1 000 mg/l, 100 mg/l и 10 mg/l, за да определи подходящият диапазон.

Референтен химикал

21. Приготвя се воден разтвор на 3,5-дихлорофенол (10 g/l), като постепенно се прибавя минималното количество от 5 mol/l разтвор на натриев хидроксид към твърдото вещество, като се разбърква, докато се разтвори. След това се добавя вода за разреждане, от която е отстранен кислородът (точка 14) до необходимия обем; процесът на разтваряне може да се подпомогне със сонификация. Могат да се използват други референтни химикали, когато средният диапазон на EC₅₀ е постигнат в най-малко три изпитвания с различен инокулум (различни източници или различно време на вземането).

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ/ГРЕШКИ

22. Някои съставки на утайката вероятно биха могли да реагират с евентуални инхибитори, правейки ги недостъпни за микроорганизмите, като в резултат от това се получава по-ниско или никакво потискане. Също така, ако утайката вече съдържа химикал с потискащо действие, биха се получили погрешни резултати, когато този химикал бъде подложен на изпитването. Освен тези възможности съществуват редица идентифицирани фактори, които могат да доведат до погрешни резултати. Те са изброени в допълнение 3, заедно с методи за премахването, или поне за намаляването на грешките.

ПРОЦЕДУРА НА ИЗПИТВАНЕ

23. Броят на необходимите повторения зависи от степента на прецизност, изисквана за показанията за потискането. Ако запушалките на бутилките са достатъчно газонепроницаеми през периода на изпитването, се приготвя само една партида (най-малко три повторения) бутилки за изпитване за всяка изисквана концентрация. По подобен начин се приготвя една партида бутилки с референтен химикал и един набор от контроли. Независимо от това, ако запушалките на бутилките са надеждни само за едно или малко на брой вкарвания на игли, се приготвя партида (напр. три повторения) на бутилките за изпитване за всеки интервал (t), за който са необходими резултати от изпитвания на всички концентрации на изпитвания химикал. По подобен начин се приготвят „t“ партиди бутилки за референтния химикал и за контролите.
24. Използването на защитна камера с ръкавици (точка 12 й)) е препоръчително. Поне 30 минути преди началото на изпитването започва подаване на поток от азот през съдържащата цялото необходимо оборудване защитна камера с ръкавици. Трябва да се гарантира, че температурата на утайката се поддържа в границите на 35 °C ± 2 °C по време на обработката и херметичното затваряне на бутилките.

Предварително изпитване

25. Ако активността на утайката е неизвестна, се препоръчва да се извърши предварително изпитване. Подготвят се контроли, които да дават концентрации на твърди вещества от 10 g/l, 20 g/l и 40 g/l плюс субстрат, но не се използва изпитван химикал. Освен това се използват различни обеми реакционна смес, за да се получат три или четири отношения на обема на парното пространство към обема на течността. От резултатите от получените обеми газ на различни интервали от време, най-подходящите условия, които позволяват две дневни измервания, при които се получават значими обеми газ и се извършва изпускане на налягането, при оптимална чувствителност⁽¹⁾ без риск от експлозии.

Добавяне на изпитвани химикали

26. Разтворимите във вода изпитвани химикали се добавят в празни бутилки за изпитване (точка 12, б)) като водни разтвори (точка

⁽¹⁾ Това се отнася за опитната постановка и експерименталните условия, при които количества получени газове — от контролните празни проби и от съдовете, показващи 70-80 % потискане — могат да бъдат оценени с приемливи граници на грешката.

▼ M6

18). Използват се набори бутилки с поне три повторения за всеки диапазон на концентрациите (точка 20). В случай на неразтворим и малко разтворим изпитван химикал, разтвор на този химикал в органичен разтворител се инжектира, с помощта на микроспринцовка, в празна бутилка за получаване на набори с повторения от всичките пет концентрации на изпитвания химикал. Разтворителят се изпарява чрез прекарване на струя азот над повърхността на разтвора в бутилката за изпитване. Като алтернатива, към бутилката за изпитване директно се добавя претеглено количество неразтворим химикал в твърдо състояние.

27. Ако неразтворим или малко разтворим във вода течен изпитван химикал не е добавен с използването на разтворите, той се добавя директно към бутилката за изпитване чрез микроспринцовка след добавянето на инокулума и субстрата за изпитването (вж. точка 30). Летливите изпитвани химикали могат да се добавят по същия начин.

Добавяне на инокулум и субстрат

28. Разбърква се подходящ обем от пресятата разграждаща се утайка (вж. точка 16) в бутилка от 5 литра (параграф 12, ж), като едновременно с това се пропуска поток от азот през парното пространство. Бутилките за изпитване, съдържащи водни разтвори или разтвори с изпарен разтворител, се продухват с поток от азот за около две минути за отстраняване на въздуха. Аликвотни части, например 100 ml, от добре разбърканата утайка се поставят в бутилките за изпитване с помощта на пипета с широк връх или мерителен цилиндър. От съществено значение е пипетата да се напълни в една стъпка до точното изискуемо количество утайка, поради това че твърдите вещества в утайката се утаяват бързо. Ако е взето по-голямо количество, пипетата се изпразва и пълненето започва отначало.
29. След това се добавя достатъчно количество разтвор на субстрат (точка 17) за получаване на концентрация в сместа от 2 g/l поотделно за хранителния бульон, екстракта от дрожди и D-глюкозата, като същевременно продължава подаването на азот. По-долу е даден пример за партиди за изпитване.

Крайна масова концентрация на изпитвания химикал в бутилките за изпитване (mg/l)	Обем на изпитвания химикал (ml)		Реактиви и среди (ml)		
	Изходен разтвор а) 10 g/l т. 18	Изходен разтвор б) 1 g/l т. 18	Вода за разреждане т. 14	Инокулум т. 16	Субстрат т. 17
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Общ обем на бутилката = 160 ml. Обем на течността = 103 ml

Газов обем = 57 ml, или 35,6 % от общия обем.

30. По подобен начин се продухват с азот празни бутилки за изпитване в достатъчно количество за работа с всякакви летливи и неразтворими течни изпитвани химикали (вж. точка 27).

▼ **M6****Контроли и референтен химикал**

31. Приготвят се набори бутилки с поне три повторения, съдържащи само утайки и субстрат, за да служат като контроли. Приготвят се бутилки за допълнителни повторения, съдържащи утайка и субстрат плюс достатъчно изходен разтвор на референтния химикал, 3,5-дихлорофенол (точка 21), до получаване на крайна концентрация от 150 mg/l. Тази концентрация следва да потисне получаването на газове с около 50 %. Като алтернатива се приготвя диапазон от концентрации на референтния химикал. Освен това се приготвят четири допълнителни бутилки за измерване на рН, които съдържат утайка, вода, от която е отстранен кислородът, и субстрат. Към двете бутилки за изпитване при най-високата концентрация се добавя изпитвания химикал, а към останалите две бутилки се добавя вода, от която е отстранен кислородът.
32. Гарантира се, че всички бутилки — с изпитвания химикал, с референтния химикал и с контролите — съдържат един и същ обем (V_R) течност; ако е необходимо, за постигане на желанния обем се добавя дейонизирана вода, от която е отстранен кислородът (точка 14). Парното пространство трябва да е между 10 % и 40 % от обема на бутилката, като действителната стойност се избира от данните, получени при предварителното изпитване. След добавяне на всички съставки в бутилките иглата, през която се подава газ, се отстранява и всяка бутилка се затваря херметически с гумена запушалка и алуминиева капачка (точка 12 б)), като запушалката се овлажнява с капка дейонизирана вода за улесняване на запушването. Съдържанието на всяка бутилка се размесва чрез разклащане.

Инкубиране на бутилки

33. Бутилките се прехвърлят в термостатично контролирания инкубатор, в който се поддържа температура $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, и който за предпочитане е оборудван с устройство за разклащане. Бутилките се инкубират на тъмно. След около 1 час налягането в бутилките се изравнява с атмосферното чрез вкарване на иглата от спринцовка, прикрепена към манометъра (точка 12, в)), през запушалката на всяка следваща бутилка, клапанът се отваря, докато манометърът покаже нула и накрая клапанът се затваря. Иглата следва да бъде вкарана под ъгъл от около 45° , за да се предотврати изтичане на газове от бутилката. Ако бутилките са инкубирани без устройство за разклащане, извършва се ръчно разклащане по два пъти всеки ден по време на целия период на инкубиране, за да достигне равновесие системата. Бутилките се инкубират и се обръщат, за да се предотврати всякаква загуба на газ през запушалката. Обръщането не е подходящо обаче когато неразтворимите изпитвани химикали могат да останат по дъното на бутилката.

Измерване на налягането

34. Когато бутилките достигнат $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, стойността на рН на съдържимото в две от четирите бутилки, приготвени за целта, се измерва и записва, а съдържанието се изхвърля; продължава се с инкубирането на тъмно на оставащите бутилки. Налягането в бутилките се измерва и се записва два пъти дневно в продължение на следващите 48 до 72 часа, чрез вкарване на иглата на манометъра през запушалката на всяка следваща бутилка, като между измерванията иглата се подсушава. Всички части на бутилката се поддържат при температурата на инкубирането по време на измерването, което трябва да се извърши възможно най-бързо. Дава се възможност показанията за налягането да се стабилизират, след което същите се регистрират. След това клапанът се отваря за вентилиране и се затваря, когато налягането покаже нулева стойност. Изпитването се продължава обикновено в продължение на 48 часа, считано от времето на първото изравняване на налягането, определено като „време 0“. Броят на показанията и вентилиранята за летливи химикали следва да бъде ограничен до едно (в края на инкубацията) или две, за да се избегне загуба на изпитвания химикал (10).
35. Ако показанията за налягането са отрицателни, клапанът не следва да се отваря. Понякога в иглата от спринцовка и в тръбите се натрупва влага, което води до леко отрицателни показания за налягането. В този случай иглата се отстранява, тръбите се разклащат, подсушава се с тъкан и се поставя нова игла.

Измерване на рН

36. След последното измерване на налягането стойността на рН на съдържимото във всяка бутилката се измерва и се записва.

▼ **M6****ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ****Представяне на резултатите**

37. Изчислява се сумата и средната стойност на записаните налягания, получени при всеки интервал от време за всеки набор от бутилки с повторения, изчислява се средната кумулативна брутна стойност на налягането на газовете за всеки интервал от време за всеки набор от повторения. За контролите, бутилките за изпитване и референтните бутилки се начертават кривите на средните кумулативни стойности на получените газове (P_a) спрямо времето. Избира се време върху линейната част от кривата, обикновено 48 часа, и се изчислява процентното потискане (I) за всяка концентрация от уравнение [1]:

$$I = (1 - P_t/P_c) \times 100 \quad [1],$$

където

I = процентно потискане в %;

P_t = налягане на газовете, получено с изпитвания материал в избрания момент (в Pa);

P_c = налягане на газовете, получено в контролата в същия избран момент (в Pa);

Би било уместно да се начертаят двете графики, т.е., графика I спрямо концентрацията и също така спрямо логаритъма на концентрацията, така че да може да бъде избрана кривата, която в по-голяма степен се доближава до линейна зависимост. Стойността на EC_{50} (mg/l) се оценява или визуално, или чрез регресионен анализ от кривата, която в по-голяма степен се доближава до линейна зависимост. За целите на сравнението може да се окаже по-полезно концентрацията на химикала да се изрази в mg химикал на g от общото количество сухо вещество. За получаване на тази концентрация обемната концентрация (mg/l) се разделя на обемната концентрация на твърдите вещества в изсушената утайка (g/l) (точка 16).

38. Изчислява се процентното потискане, достигнато при единствената концентрация на използвания референтен химикал, или EC_{50} , ако са били изследвани достатъчен брой концентрации.
39. Средното налягане на газовете, получени в контролата $P_c(P_a)$ се превръща в обем по калибрационната крива на манометъра (допълнение 2) и от това се изчислява добивът на газ, изразен като обем, получен за 48 часа от 100 ml неразредена утайка с концентрация на твърди вещества от 2 % (20 g/l) до 4 % (40 g/l).

Критерии за валидност

40. Резултатите от междулабораторното изпитване на ISO (5) са показали, че референтният химикал (3,5-дихлорофенол) е довел до 50 % потискане на получаването на газове в диапазон от концентрации от 32 mg/l до 510 mg/l при средна стойност 153 mg/l (точка 10). Този диапазон е толкова широк, че като критерии за валидност не могат с необходимата доверителност да бъдат определени твърди гранични стойности на потискането; това следва да стане възможно, когато в нови разработки бъде показано как да се получи инокулум по последователен начин. Обемите на газовете, получените в контролните бутилки за 48 часа, са варирали от 21 ml на g сухо вещество в утайката до 149 ml/g (средно 72 ml/g). Не е била установена очевидна връзка между обема на получените газове и съответната стойност на EC_{50} . Крайната стойност на pH е варирала между 6,1 и 7,5.
41. Изпитването се счита за валидно ако в референтната контрола, съдържаща 150 mg/l 3,5-дихлорофенол, бъде получено потискане над 20 %, в празната контрола са получени повече от 50 ml газове на g сухо вещество и в края на изпитването стойността на pH е в диапазона от 6,2 до 7,5.

Протокол от изпитването

42. Протоколът от изпитването трябва да съдържа следната информация:

Изпитван химикал

— общоприето наименование, химично наименование, номер по CAS, структурна формула и съответни физични и химични свойства;

▼ M6

— чистота (онечиствания) на изпитвания химикал.

Условия на изпитването

- обеми на течността и на парното пространство в съдовете за изпитване;
- описания на съдовете за изпитване и измерването на газовете (напр. тип на манометъра);
- прилагане на изпитвания и референтния химикал в системата за изпитване, използвани концентрации на изпитване и използване на разтворители;
- подробни данни за използвания инокулум: наименование на пречиствателната станция за отпадъчни води, описание на източника на пречистваните отпадъчни води (напр. работна температура, време на задържане на утайката, дали е представлява предимно битови отпадъчни води или промишлени отпадъци и др.), концентрация на твърди вещества, водеща до получаване на газове
- активност в анаеробния реактор, предходна експозиция или предварително адаптиране към токсични химикали или място на вземане на кал, утайка и т.н.;
- температура и температурен обхват на инкубирането;

брой на повторенията.

- Резултати
- стойности на рН в края на изпитването;
- всички измерени данни, събрани в съдовете за изпитване, празните проби и съдовете с контроли с референтен химикал, при необходимост (напр. налягане в Ра или милибари) в табличен вид;
- процентно потискане в бутилките за изпитването и в референтните бутилки, и кривите концентрация-потискане;
- изчисляване на стойностите на EC₅₀, изразени в mg/l и mg/g;
- получени газове за g утайка за 48 часа;
- причини за всякакво отхвърляне на резултатите от изпитването, обсъждане на резултатите, включително всякакви отклонения от процедурите в настоящия метод за изпитване, и обсъждане на всякакви неочаквани отклонения в резултатите от изпитването, дължащи се на интерференция и грешки;
- засягане и на въпроса дали целта на изпитването е била да се измери токсичността по отношение на микроорганизми, които са били, или не са били предварително експонирани.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Глава В.11 от настоящото приложение: Изпитване за потискане дишането на активна утайка.
- (2) Глава В.43 от настоящото приложение: Анаеробна биоразградимост на органични съединения в разградена утайка: метод чрез измерване на получаването на газ.
- (3) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1: General Test.
- (4) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 2: Test for low biomass concentrations.
- (5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

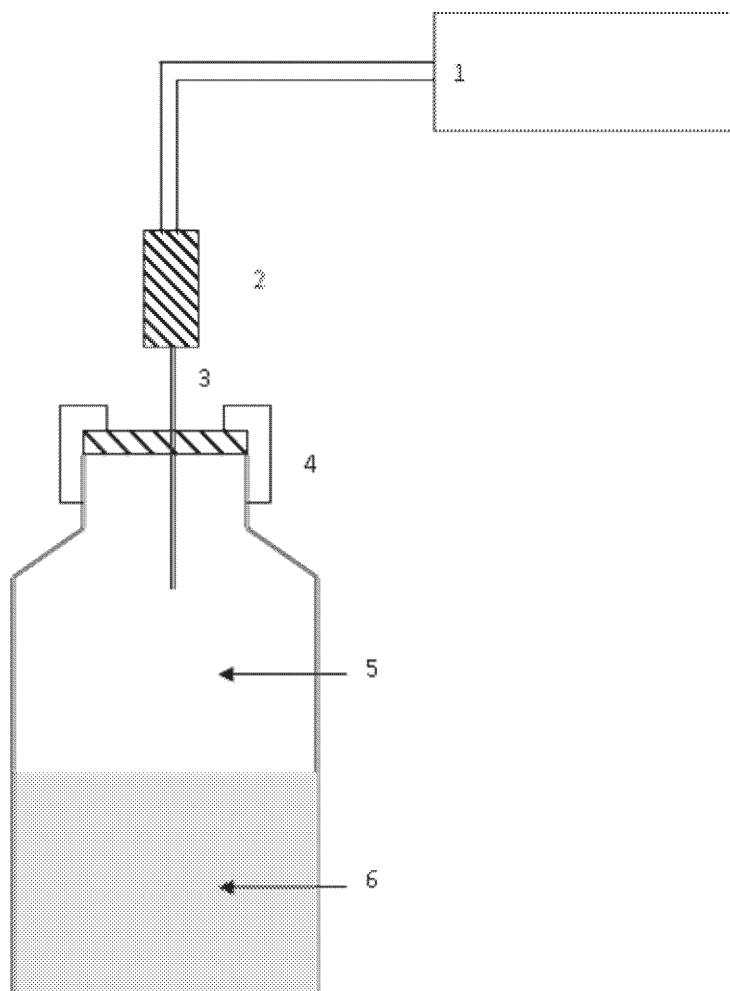
▼ M6

- (6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. *Wat. Pollut. Control*, 70, 58-70.
- (7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.
- (8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Env. Microbiol.* 47 850-857.
- (9) Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. *Chemosphere* 17, 2441-2460.
- (10) Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. *Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods*, GSF Forschungszentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp 117-132 (1992).
- (11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, and Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. *Chemosphere*, 39 (12), 2007-2018.
- (12) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
- (13) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼ **M6**

Допълнение 1

Пример за апаратура за измерване на получения биогаз чрез налягане на газовете



Легенда:

- 1 — манометър
- 2 — 3-пътен газонепроницаем клапан
- 3 — игла от спринцовка
- 4 — газонепроницаема капсулирана запушалка (капачка за капсулиране и септа)
- 5 — парно пространство
- 6 — инокулум с разградена утайка

Съдове за изпитване в среда от $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

▼ M6

Допълнение 2

Преобразуване на показанията на манометъра

Показанията на манометъра могат да бъдат съотнесени с обемите газ чрез стандартна крива и оттам могат да се изчислят обемите газове, получени на g суха утайка за 48 часа. Този индекс на активността се използва като един от критериите, по които да се оцени валидността на резултатите от изпитването. Калибрационната крива се получава чрез инжектиране на известни обеми газ при температура $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ в серумни бутилки, съдържащи обем вода, равен на този на реакционната смес, V_R ;

- Аликвотни части от V_R ml вода, съхранявана при температура $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, се поставят в пет серумни бутилки за изпитване. Бутилките се затварят херметически и се поставят на водна баня при температура $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ за 1 час за достигане на равновесие;
- Включва се манометърът, оставя се да се стабилизира и се коригира до нула;
- Иглата от спринцовка се вкарва през капсулираната запушалка на една от бутилките, клапанът се отваря до отчитане на стойност нула от манометъра и след това се затваря;
- Процедурата се повтаря с останалите бутилки;
- Във всяка бутилка се инжектира 1 ml въздух при $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Иглата (върху манометъра) се вкарва през херметично затворената запушалка на една от бутилките и се дава възможност за стабилизиране на показанията. Показанията за налягането се записват, клапанът се отваря до отчитане на стойност нула от манометъра и след това се затваря;
- Процедурата се повтаря с останалите бутилки;
- Цялата процедура се повтаря, като се използват 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml и 50 ml въздух;
- Начертава се крива на преобразуване на налягането (P_a) спрямо инжектирания обем газ (ml). Откликът на инструмента е линеен в интервала от 0 до 70 000 P_a , и от 0 ml до 50 ml получен газ.

▼ **M6***Допълнение 3***Идентифицирани фактори, които могат да доведат до погрешни резултати**а) *Качество на капачките на бутилките*

В търговската мрежа са налични различни видове септи за серумни бутилки; при условията на настоящото изпитване много от тях, включително направени от бутилов каучук, губят херметичността си след пробиване с игла. Понякога налягането се понижава много бавно след пробиването на септата с иглата от спринцовка. За преодоляване на изтичане се препоръчва използване на газонепроницаеми септи (точка 12 б)).

б) *Влага в иглата от спринцовка*

Понякога в иглата от спринцовка и в тръбите се натрупва влага и това дава леко отрицателни показания за налягането. За коригиране иглата се отстранява, тръбите се разклащат, подсушава се с тъкан и се поставя нова игла (точки 12 в) и 35).

в) *Замърсяване с кислород*

При анаеробните методи може да се получи грешка в резултат от замърсяване с кислород, което може да доведе до по-ниски стойности на произведените количества газ. В настоящия метод тази възможност следва да бъде сведена до минимум чрез използване на строго анаеробни техники, включително използване на защитна камера с ръкавици.

г) *Груби субстрати в утайки*

Анаеробното получаване на газ и чувствителността на утайката се влияят от субстрати, които се прехвърлят с инокулува в бутилките за изпитване. Разградената утайка от анаеробните реактори за битови отпадъчни води все още често съдържа видими материали като косми и растителни остатъци от целулоза, които по принцип затрудняват вземането на представителни проби. Чрез прекарване на утайката през сито грубите неразтворими материали могат да бъдат отстранени, което прави вземането на представителни проби по-вероятно (точка 16).

д) *Летливи изпитвани химикали*

Летливите изпитвани химикали ще бъдат освободени в парното пространство на бутилките за изпитване. Това може да доведе до загуба на част от изпитвания материал от системата по време на пропускането на газове след измерване на налягането, което да доведе до неверни високи стойности на ЕС₅₀. Грешката може да се намали чрез подходящ избор на съотношението между обемите на течността и на парното пространство и чрез непропускане на газове след измерване на налягането (10).

е) *Нелинейност при получаването на газове*

Ако графиката на средните кумулативни стойности за получените газове спрямо периода на инкубирането не е приблизително линейна в 48-часовия период, точността на изпитването може да бъде занижена. За да се преодолее този проблем, може да е препоръчително да се използва разграждаща се утайка от друг източник и/или добавяне на по-висока концентрация на изпитван субстрат — хранителен бульон, екстракт от дрожди и глюкоза (точка 29).

▼ **M6***Допълнение 4***Прилагане към проби от околната среда с ниска концентрация на биомаса — анаеробна кал, утайки т.н.****ВЪВЕДЕНИЕ**

- A.1 По принцип специфичната микробна активност (обемът получени газове за g сухо вещество) на срещаща се в природата анаеробна кал, утайки, почви и т.н., е много по-ниска от това на анаеробната утайка с произход от отпадъчни води. Поради това, когато трябва да бъде измерено потискащото въздействие на химикали върху тези по-слабо активни проби, някои от експерименталните условия трябва да бъдат изменени. За тези по-слабо активни проби съществуват два общи начина на действие:
- a) Извършване на модифицирано предварително изпитване (точка 25) с неразредената проба от кал, почва и т.н. при $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ или при температурата на мястото на вземане на пробата, за постигането на по-точна симулация (като в част 1 от стандарта ISO 13641);
 - б) Или извършване на изпитването с разредена (1 на 100) утайка от реактор, за симулиране на слабата активност, очаквана от взетата от околната среда проба, но с поддържане на температура $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (като в част 2 от стандарта ISO 13641).
- A.2 Вариант а) може да бъде постигнат, като се следва описаният тук метод (еквивалентен на част 1 от ISO 13641), но е от съществено значение да се направи предварително изпитване (точка 25), за да се установят оптимални условия, освен ако те не са вече известни от предходни изпитвания. Пробата от кал или от утайка трябва да бъде много добре размесена, напр. в хомогенизатор и, ако е необходимо, разредена с малка част вода за разреждане, от която въздухът е предварително отстранен (точка 14), така че да е достатъчно мобилна, за да се прехвърли с помощта на пипета с широк връх или мерителен цилиндър. Ако се приеме, че хранителните съставки могат да са в недостатъчно количество, пробата от кал може да се центрофугира (при анаеробни условия) и повторно да се суспендира в минералната среда, съдържаща екстракт от дрожди (A.11)
- A.3 Вариант б). Така ниската активност на пробите от околната среда се наподобява по приемлив начин, но липсва високата концентрация на суспендираните твърди вещества, присъстващи в тези проби. Ролята на тези твърди вещества при потискането не е известна, но е възможно евентуална реакция между изпитваните химикали и съставките на калта, както и адсорбция на изпитваните химикали върху твърдите вещества, да доведе до понижаване на токсичността на изпитвания химикал.
- A.4 Температурата е друг важен фактор: за стриктна симулация изпитванията трябва да се правят при температурата на мястото на вземане на пробата, тъй като за различни групи произвеждащи метан консорциуми от бактерии се знае, че функционират в различни температурни обхвати, а именно термофили (~ 30-35 °C), мезофили (20-25 °C) и психрофили (< 20 °C), което може да доведе до проява на различни модели на потискане.
- A.5 Продължителност. По време на кръговото изпитване, в част 1 от общото изпитване, чрез използване на неразредена утайка, получаването на газ в рамките на 2-4 дни е било винаги достатъчно, докато в част 2, с разредена едно към сто утайка, за този период получаването на газ е било недостатъчно, ако въобще е имало такова. При описанието на това изпитване Madsen et al (1996) споменават, че трябва да бъдат дадени поне 7 дни.

Изпитване с ниска концентрация на биомасата (вариант б)

Следните изменения и допълнения следва да бъдат направени за добавяне или замяна на някои съществуващи точки и подточки от основния текст.

▼ **M6**

A.6 Към точка 6 се добавя: Принцип на изпитването;

„Тази техника може да се използва с разрежена 1 към 100 анаеробна утайка, частично за симулиране на слабата активност на кал и утайки. Температурата на инкубиране може да бъде или 35 °C, или тази на мястото, от което е била взета пробата. Тъй като бактериалната активност е много по-ниска в сравнение с неразредената утайка, периодът на инкубирането следва да бъде удължен на най-малко 7 дни.“

A.7 Към точка 12 а) се добавя следното:

„инкубаторът следва да може да работи до температури с долна граница 15 °C.“

A.8 След точка 13 се добавя допълнителен реактив:

„фосфорна киселина (H₃PO₄), 85 масови % във вода.“

A.9 В края на точка 16 се добавя следното:

„При изпитването се използва крайна концентрация от 0,20 ± 0,05 g/l общо сухо вещество.“

A.10 Точка 17. Субстрат за изпитването

Този субстрат следва да не се използва, а да се замени с екстракт от дрожди (вж. точки 17; A.11, A.12, A.13).

A.11 За разтваряне на анаеробната утайка се изисква минерална среда, включително микроелементи, като за улеснение към тази среда се добавя органичният субстрат, екстракт от дрожди.

След точка 17 се добавя следното:

„а) Минерална среда за изпитване с екстракт от дрожди.

Тя се приготвя от 10-кратно концентрирана среда за изпитване (точка 17, б); A.12) с разтвор на микроелементи (точка 17, в)); A.13). Използва се прясно доставен натриев сулфид нонахидрат (точка 17, б); A.12) или се измива и изсушава преди използване, за да се гарантира, че разполага с достатъчна редуцираща способност. Ако изпитването е проведено без използване на защитна камера с ръкавици (точка 12, й), концентрацията на натриев сулфид в изходния разтвор следва да се увеличи до 2 g/l (от 1 g/l). Натриев сулфид може също да се добави, до получаване на крайна концентрация 0,2 g/l, от подходящ изходен разтвор през септата на затворените бутилки за изпитване, тъй като тази процедура ще доведе до намаляване на риска от окисление. Като алтернатива може да се използва титанов(III) цитрат (точка 17, б). Добавя се през септата на затворените бутилки за изпитване, до получаване на концентрация от 0,8 mmol/l до 1,0 mmol/l. Титановият(III) цитрат е високо ефективен и ниско токсичен редуктор, който се изготвя, както следва: Разтварят се 2,94 g тринатриев цитрат дихидрат с 50 ml вода за разреждане, несъдържаща кислород, (точка 14) (което води до 200 mmol/l разтвор) и се добавят 5 ml разтвор на титанов(III) хлорид (15 g/100 ml вода за разреждане). Неутрализира се до рН 7 ± 0,5 с натриев карбонат и се поставя в подходяща серумна бутилка в струя от газообразен азот. Концентрацията на титановия(III) цитрат в този изходен разтвор е 164 mmol/l. Средата за изпитване се използва незабавно или се съхранява при 4 °C за не повече от 1 ден.

A.12 б) Десетократно концентрирана среда за изпитване, приготвена със следното:

безводен калиев дихидрогенфосфат (KH ₂ PO ₄)	2,7 g
динатриев хидрогенфосфат (Na ₂ HPO ₄)	4,4 g
(или 11,2 g додекахидрат)	5,3 g
амониев хлорид (NH ₄ Cl)	

▼ **M6**

калциев хлорид дихидрат ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,75 g
магнезиев хлорид хексахидрат ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
железен(II) хлорид тетрагидрат ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,2 g
ресазурин (редокси индикатор)	0,01 g
натриев сулфид наонахидрат ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
(или титанов(III) цитрат) крайна концентрация	0,8 mmol/l до 1,0 mmol/l
разтвор на микроелементи (вж. точка 17, в); A.13)	10,0 ml
екстракт от дрожди	100 g
Разтваря се във вода за разреждане (точка 14) и се долива до:	1 000 ml

A.13 в) разтвор на микроелементи, приготвен със следното:

манганов(II) хлорид тетрагидрат ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
ортоборна киселина (H_3BO_3)	0,05 g
цинков хлорид (ZnCl_2)	0,05 g
меден(II) хлорид (CuCl_2)	0,03 g
натриев молибдат дихидрат ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,01 g
кобалтов(II) хлорид хексахидрат ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
никелов(II) хлорид хексахидрат ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
динатриев селенит (Na_2SeO_3)	0,05 g
Разтваря се във вода за разреждане (точка 14) и се долива до:	1 000 ml ⁴⁴

A.14 Точка 25: Предварително изпитване

От съществено значение е да се извърши предварително изпитване, както е описано в точка 24, с изключение на това, че концентрацията на твърдите вещества в утайката трябва да бъде една стотна от посочените, т.е., 0,1 g/l, 0,2 g/l и 0,4 g/l. Продължителността на инкубирането трябва да бъде поне 7 дни.

Бележка: В кръговото изпитване (5) парното пространство е било прекомерно високо, в размер на 75 % от общия обем; то следва да бъде в препоръчания обхват от 10 %- 40 %. Относитият критерий е, че обемът газове, получен при около 80 % потискане, следва да може да се измери с приемлива прецизност (например $\pm 5\%$ до $\pm 10\%$).

A.15 Точки от 26 до 30: Добавяне на изпитван химикал, инокулум и субстрат.

Добавянията се извършват по същия начин, както е описано в тези точки, но разтворът на субстрата (точка 17) се заменя с изпитваната среда плюс среда от екстракт от дрожди (A.11).

Също така, крайната концентрация на твърдите вещества в утайката се намалява от 2 g/l—4 g/l до 0,2 g/l \pm 0,05 g/l (A.9). Два примера за добавяне на съставки към сместа за изпитване са дадени в таблица A.1, която заменя таблицата в точка 29.

A.16 Точка 33: Инкубиране на бутилки

Поради очакваната по-малка скорост на получаване на газове инкубирането се извършва в продължение на най-малко 7 дни.

▼ **M6**

A.17 Точка 34: Измерване на налягането

Ако се изискват количествата в газовата фаза, прилага се същата процедура за измерване на налягането в парното пространство, както описаната в точка 34. Ако следва да се измерват общите количества на CO_2 и CH_4 , рН на течната фаза се намалява до около рН 2 чрез инжектиране на H_3PO_4 във всяка съответна бутилка и налягането се измерва след 30 минути разклатене при температурата на изпитването. Независимо от това, повече информация относно качеството на инокулума може да бъде получена чрез измерване на налягането във всяка бутилка преди и след подкисляването. Например когато скоростта на получаване на CO_2 е много по-висока от тази на метана, вероятно чувствителността на ферментативните бактерии се е променила и/или въздействието на изпитвания химикал е преференциално върху метаногенните бактерии.

A.18 Точка 36: измерване на рН

Ако следва да се използва H_3PO_4 , особено за измерването на рН, следва да се приготвят няколко допълнителни бутилки, към които се добавя H_3PO_4 .

ПОЗОВАВАНЕ:

Madsen, T, Rasmussen, NB; and Nilsson, L (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhagen.

Таблица А.1.

Примери за подготовка на изпитването за партиди за изпитване

Съставки на реакционната смес	Пример 1	Пример 2	Нормална последователност на добавянето
Концентрация на приготвения инокулум (g/l)	0,42	2,1	—
Обем на добавения инокулум (ml)	45	9	4
Концентрация на инокулума в бутилките за изпитване (g/l)	0,20	0,20	—
Обем на добавената среда за изпитване (ml)	9	9	2
Обем на добавената вода за разреждане (ml)	36	72	3
Концентрация на екстракта от дрожди в бутилките за изпитване (g/l)	9,7	9,7	—
Обем на изходния разтвор на изпитвания химикал (ml)	3	3	1
Общ обем на течността (ml)	93	93	—

▼ **M6**

Допълнение 5

Определения

За целите на настоящия метод за изпитване са използвани следните определения:

Химикал означава вещество или смес.

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

▼ M6**В.35. ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ЗА ВИДОВЕ ОТ РОД *LUMBRICULUS* С ИЗПОЛЗВАНЕ НА СЕДИМЕНТ С ДОБАВКА В СИСТЕМА СЕДИМЕНТ-ВОДА**

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСР (TG) 225 (2007). Хранещият се със седименти ендобентос е с потенциално висока експозиция на свързани със седиментите химикали и следователно трябва да му се отдаде приоритетно внимание, напр. (1), (2), (3). Сред тези хранещи се със седименти водните олигохети играят важна роля в седиментите на водните системи. Чрез биотурбация на седиментите и като служат за жертви на други животни, тези животни могат да окажат силно влияние върху бионаличността на такива химикали за други организми, като рибите, хранещи се с бентос. За разлика от епибентосните организми, ендобентосните водни олигохети (напр. *Lumbriculus variegatus*) се заравят в седимента и поглъщат частици от него под повърхността му. Това гарантира експозиция на изпитваните организми на изпитвания химикал по всички възможни пътища (напр. контакт със замърсени частици от седимента, както и поглъщане на такива частици, а също и чрез водата между частиците на седимента и водата над седимента).
2. Настоящият метод за изпитване е предназначен за оценка на въздействието на продължителната експозиция на ендобентосния олигохет *Lumbriculus variegatus* (Müller) към свързани със седимента химикали. Методът се основава на съществуващите протоколи за изпитване на токсичността на седименти и биоаккумуляцията, напр. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Методът е описан за статични условия на изпитване. Сценарият за експозиция, който се използва в настоящия метод за изпитване, е добавяне на изпитвания химикал към седимента. Използването на седимент с добавка цели да симулира седимент, замърсен с изпитвания химикал.
3. Химикалите, които трябва да бъдат изпитани с помощта на организми, живеещи в седимента, обикновено се задържат 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 и крайната му съдба в организма. За силно адсорбиращите химикали (напр. с $\log K_{ow} > 5$) или за химикали, които образуват ковалентна връзка със седимента, поглъщането на замърсена храна може да бъде значим път на експозиция. За да не се подцени токсичността на такива химикали, храната, необходима за размножаването и растежа на изпитваните организми се добавя към седимента, преди да бъде приложен изпитваният химикал (11). Описаният метод за изпитване е описан достатъчно подробно, така че изпитването да може да бъде проведено, като същевременно се дава възможност за адаптиране на плана на проучването в зависимост от условията в отделните лаборатории и различните характеристики на изпитваните химикали.
4. Методът за изпитване е насочен към определяне на въздействието на изпитвания химикал върху размножаването и биомасата на изпитваните организми. Измервани биологични параметри са общият брой на преживелите червеи и биомасата (сухо тегло) в края на експозицията. Тези данни се анализират или като се използва регресионен модел, за да се оцени концентрацията, която би предизвикала въздействие от x % (напр. EC_{50} , EC_{25} и EC_{10}), или като се използва статистическо тестване на хипотези за определяне на концентрацията без наблюдавано въздействие (NOEC) и най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC).
5. Глава В.27 от настоящото приложение, „Изпитване за токсичност за хириномиди в система вода-седимент с използване на седимент с добавка“ (6), предоставя множество важни и полезни данни за прилагането на представения метод за изпитване за токсичност на седименти. Следователно посоченият документ служи като основа, в която са внесени изменения, необходими за провеждането на изпитвания за токсичност на седименти с *Lumbriculus variegatus*. Други документи, на които има позоваване, са напр. Ръководството на ASTM за определяне на биоаккумуляцията на свързани със седименти замърсители от бентосни безгръбначни (3), методите на EPA на САЩ за

▼ **M6**

измерване на токсичност и биоаккумуляция на свързани със седименти замърсители със сладководни безгръбначни (7), и в Ръководството на ASTM за събиране, съхранение, характеризиране и манипулиране на седименти за токсикологични изпитвания и за избор на уреди за вземане на проби, използвани за събиране на бентосни безгръбначни (12). Освен това, практическят опит, получен при кръгово изпитване на метода за изпитване (13), протоколът от кръговото изпитване, както и информация от литературата са важни източници на информация за изготвянето на този документ.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА НЕОБХОДИМИТЕ УСЛОВИЯ И НАСОКИ

6. Информация за изпитвания химикал като напр. мерки за безопасност, правилни условия за съхранение и методи за анализ, следва да бъде получена преди започването на изследването. Насоки за изпитване на химикали с физични и химични свойства, които ги правят трудни за такова изпитване, са дадени в (14).
7. Преди провеждане на изпитване трябва да бъде известна следната информация за изпитвания химикал:
 - общоприето наименование, химично наименование (за предпочитане по IUPAC) структурна формула, номер по CAS, чистота;
 - парно налягане;
 - разтворимост във вода.
8. Следната допълнителна информация се счита за полезна преди началото на изпитването:
 - коефициент на разпределение октанол-вода, K_{ow} ;
 - коефициент на разпределение органичен въглерод-вода, изразен като K_{oc} ;
 - хидролиза;
 - фототрансформация във вода;
 - биоразградимост;
 - повърхностно напрежение.
9. Преди започване на изпитването следва да е получена информация относно някои характеристики на седимента, който ще се използва (7). За подробности вж. точки 22—25;

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

10. Червеи със сходен физиологичен статус (синхронизирани, както е описано в допълнение 5) се експонират на поредица от токсични концентрации, приложени към фазата на седимента от системата седимент—вода. Като среди следва да се използват изкуствен седимент и възстановена вода. Съдовете за изпитване без добавен изпитван химикал служат като контроли. Изпитваният химикал се добавя към седимента в насипно състояние за всяко равнище на концентрация, за да се сведе до минимум варирането между повторенията на всяко равнище на концентрация, и впоследствие изпитваните организми се въвеждат в съдовете за изпитване, в които концентрациите на водата и на седимента са достигнали равновесно състояние (вж. точка 29). Изпитваните животни се експонират на системите седимент—вода за период от 28 дни. С оглед на ниското съдържание на храна в изкуствения седимент, към същия трябва да бъде добавен източник на храна (вж. точки 22 и 23, и допълнение 4), за да се гарантира растежът и размножаването на червеите при контролираните условия. По този начин се гарантира, че изпитваните животни са експонирани както чрез водата и седиментите, така и чрез храната си.
11. Предпочитаната крайна точка при този тип изследване е EC_x (напр. EC_{50} , EC_{25} и EC_{10} ; ефективна концентрация, при която се наблюдава въздействие върху x % от изпитваните организми) съответно за размножаването и биомасата, в сравнение с контролата. Следва обаче да се отбележи, че като се има предвид голямата неопределеност при ниски

▼ M6

ЕС_x (напр. ЕС₁₀, ЕС₂₅) с изключително високи 95 %-ни доверителни граници (напр. (15)) и статистическата мощност, изчислена по време на тестването на хипотези, ЕС₅₀ се разглежда като най-устойчивата крайна точка. В допълнение, концентрацията без наблюдавано въздействие (NOEC) и най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC) могат да се изчислят за биомасата и размножаването, ако планът на изпитването и данните са в подкрепа на тези изчисления (вж. точки 34—38). Целта на изследването, извеждането ЕС_x или NOEC, определя плана на изпитването.

РЕФЕРЕНТНИ ИЗПИТВАНЯ

12. Резултатите при контролните организми се очаква да покажат в достатъчна степен капацитета на дадена лаборатория да извършва изпитването и, ако са налични данни за предходни периоди, повторемостта на изпитването. Освен това референтните изпитвания за токсичност могат да се извършват на редовни интервали с използване на референтно токсично вещество за оценка на чувствителността на изпитваните организми. Референтни изпитвания за токсичност само във водата с продължителност 96 h могат да докажат в задоволителна степен чувствителността и състоянието на изпитваните животни (4) (7). Информация за токсичността на пентахлорофенол (PCP) в пълни изпитвания (28 дни експозиция на седимент с добавка) е включена в допълнение 6 и в протокола от кръговото изпитване на метода за изпитване (13). Острата токсичност на PCP само във вода е описана например в (16). Тази информация може да се използва за сравняване на чувствителността на изпитван организъм в референтни изпитвания с PCP като референтно токсично вещество. Калиев хлорид (KCl) и меден сулфат (CuSO₄) се препоръчват като референтни токсични вещества при *L. variegatus* (4) (7). Към днешна дата установяването на критерии за качество въз основа на данни за токсичността за KCl е трудно поради липсата на данни за *L. variegatus* в литературата. Информация за токсичността на медта към *L. variegatus* може да бъде намерена в (17)—(21).

ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

13. За да е валидно дадено изпитване, трябва да бъдат изпълнени следните изисквания:
- Кръгово изпитване (13) е показало, че за *Lumbriculus variegatus* средният брой на живите червеи на повторение при контролите следва да се е увеличил с кратност от най-малко 1,8 в края на експозицията в сравнение с броя на червеите на повторение в началото на експозицията.
 - Стойността на рН на водата над седимента следва да бъде между 6 и 9 по време на изпитването.
 - Концентрацията на кислород във водата над седимента следва да не бъде под 30 % от стойността на насищането с разтворен въздух при температурата на изпитване по време на изпитването.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Система за изпитване

14. Препоръчителни са статични системи без обновяване на водата над седимента. Ако отношението на седимента към водата (вж. точка 15) е подходящо, леко аериране обикновено ще е достатъчно за поддържане на качеството на водата на приемливи равнища за изпитваните организми (напр. увеличаване до максимум на стойностите на разтворения кислород, свеждане до минимум на натрупването на екскреторни продукти). Полустиатични или проточни системи с периодично или непрекъснато обновяване на водата над седимента следва да се използват само в изключителни случаи, тъй като редовното обновяване на водата над седимента се очаква да засегне химичното равновесие (напр. загуба на изпитвания химикал от системата за изпитване).

Съдове и оборудване за изпитването

15. Експозицията следва да се извършва в стъклени бехерови чаши с вместимост напр. от 250 ml с диаметър 6 cm. Могат да се използват други стъклени съдове, но те следва да осигуряват подходяща дълбочина на водата над седимента и на самия седимент. Във всеки съд следва да бъде получен слой от около 1,5—3 cm формулиран седимент. Съотношението между дебелината на слоя седимент и тази на водата над

▼ **M6**

него трябва да бъде 1:4. Съдовете трябва да бъдат с подходящ капацитет в съответствие със степента на зареждане, т.е., броя на червеите, добавени на единица тегло на седимента (вж. също точка 39).

16. Съдовете за изпитване и другото оборудване, което ще влезе в контакт с изпитвания химикал, следва да бъдат изцяло стъклени или от друг химически инертен материал. Трябва внимателно да се избягва използването на материали за всички части от оборудването, които могат да разтворят или абсорбират изпитвани химикали, или да освободят други химикали и да окажат неблагоприятно въздействие върху изпитваните животни. За оборудването, което влиза в контакт с изпитвателната среда, следва да се използват политетрафлуороетилен, неръждаема стомана и/или стъкло. За органични химикали, за които е известно, че са адсорбируеми от стъкло, може да се наложи използването на силанизирани стъкла. В такива ситуации оборудването трябва да се изхвърли след употреба.

Животински видове за изпитването

17. Използваният вид за този тип изследване е сладководният олигохет *Lumbriculus variegatus* (Müller). Този вид е толерантен към широка гама от типове седименти и широко се използва при изпитвания за токсичност на седименти и за биоаккумуляция [напр. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Произходът на изпитваните животни, потвърждаването на видовата идентичност (напр. (36)), както и условията на отглеждането следва да се протоколират. Идентификацията на видовете не е задължителна преди всяко изпитване, ако организмите са получени при отглеждане в изпитващата лаборатория.

Отглеждане на изпитваните организми

18. С цел да се разполага с достатъчен брой червеи за провеждане на изпитвания за токсичност на седименти е полезно да се поддържа условия на непрекъснато отглеждане на червеите в лаборатория. Насоки за методите на отглеждане в лаборатория за *Lumbriculus variegatus* и източниците на стартерни култури са дадени в допълнение 5. За подробни данни относно отглеждането на този вид вж. (3), (7), (27).
19. За да се гарантира, че изпитванията се извършват с животни от същия вид, създаването на едновидови култури се препоръчва настоятелно. Гарантира се, че културите и особено червеите, използвани при изпитванията, не страдат от видими заболявания и отклонения.

Вода

20. За използване като вода над седимента в изпитванията се препоръчва възстановена вода съгласно глава В.1 от настоящото приложение (37); тя може да се използва и в лабораторните култури от червеи (за приготвянето виж допълнение 2). Ако е необходимо, може да се използва природна вода. Избраната вода трябва да е с качество, което да позволява растежа и размножаването на изпитваните видове за периодите на аклиматизация и изпитване, без същите да показват необичаен външен вид или поведение. Доказано е, че *Lumbriculus variegatus* преживява, нараства и се размножава в този вид вода (30), и е предоставено максимално стандартизиране на условията на изпитване и отглеждане. Ако се използва възстановена вода, нейният състав трябва да бъде протоколиран и преди употреба водата трябва да се охарактеризира поне чрез рН, съдържание на кислород и твърдост (изразена в mg CaCO₃/l). Анализът на водата за микрозамърсители преди нейната употреба би могъл да предостави полезна информация (виж например допълнение 3).
21. Стойността на рН на водата над седимента следва да бъде в интервала от 6,0 до 9,0 (вж. точка 13). Ако се очаква увеличаване на амонияка, счита се за полезно стойността на рН да се запази между 6,0 и 8,0. Например при изпитване на слаби органични киселини се препоръчва рН да се коригира чрез буферизиране на водата, която ще се използва в изпитването, както е описано напр. в (16). При природната вода общата твърдост на водата, която ще се използва при изпитването, следва да бъде между 90 и 300 mg CaCO₃ на литър. В допълнение 3 са обобщени допълнителните критерии за вода, приемлива за използване за зареждане в съответствие с насоки ОИСП № 210 (38).

▼ M6

Седимент

22. Тъй като незамърсени естествени седименти от конкретен източник могат да не бъдат достъпни през цялата година, а местните организми, както и наличието на микрозамърсители, могат да повлияят на изпитването, за употреба се предпочита формулиран седимент (наричан още възстановен, изкуствен или синтетичен седимент). Използването на формулиран седимент свежда до минимум варирането в условията на изпитването, както и въвеждането на местната фауна. Следният формулиран седимент се основава на изкуствения седимент по (6), (39) и (40). Препоръчва се използването му при този тип изпитване ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):
- а) 4—5 % торфен мъх (сухо тегло); важно е да се използва торф под формата на прах, степен на разграждане: „средна“, ситно смлян (размер на частиците $\leq 0,5$ mm) и изсушен само с въздух.
 - б) 20 ± 1 % каолин (сухо тегло) (за предпочитане съдържанието на каолинит да е повече от 30 %);
 - в) 75—76 % кварцов пясък (сухо тегло) (фин пясък, размер на зърната: ≤ 2 mm, но > 50 % от частиците следва да бъдат в интервала 50-200 μ m).
 - г) Дейонизирана вода, 30—50 % от сухото тегло на седимента, в допълнение към сухите съставки на седимента.
 - д) добавя се химически чист калциев карбонат (CaCO_3), за да се коригира рН на крайната смес на седимента.
 - е) Общото съдържание на органичен въглерод в крайната смес следва да бъде 2 % ($\pm 0,5$ %) от сухото тегло на седимента и следва да бъде коригирано, като се използват подходящи количества торф и пясък, в съответствие с букви а) и в).
 - ж) Храната, като например стрити на прах листа от коприва (*Urtica* sp., в съответствие с аптечните стандарти, за консумация от човека) или смес от стрити на прах листа от *Urtica* sp. с алфа-целулоза, параграф (1:1), представляващо 0,4—0,5 % от сухото тегло на седимента, в допълнение към сухите съставки на седимента; за подробно обяснение вж. допълнение 4.
23. Източниците на торф, каолин, храна и пясък трябва да са известни. В допълнение към буква ж), в глава В.27 от настоящото приложение (б) се изброяват алтернативни растителни материали за използване като източник на храна: обезводнени листа от черница (*Morus alba*), бяла детелина (*Trifolium repens*), спанак (*Spinacia oleracea*) или житни треви.
24. Избраният източник на храна следва да се добави преди или по време на добавянето на изпитвания химикал към седимента. На избрания източник на храна следва да се даде възможност най-малко за приемливо размножаване в контролите. Полезна информация преди използването на изкуствения седимент може да се получи от анализа на изкуствения седимент или на компонентите му за микрозамърсители. Пример за приготвянето на формулирания седимент е даден в допълнение 4. Допустимо е също и смесването на сухи съставки, ако се докаже, че след добавянето на водата над седимента не настъпва разделяне на съставките (напр. изплуване на торфени частици), и че торфът или седиментът е подготвен в необходимата степен (виж също точка 25 и допълнение 4). Изкуственият седимент следва да бъде характеризирани най-малко по отношение на произход на съставките, механичен състав (процент на пясък, прах и глина), общо съдържание на органичен въглерод (ТОС), съдържание на вода и рН. Измерването на редокси потенциалане е задължително.
25. Ако се изисква, например за конкретни цели на изпитвания, естествените седименти от незамърсени източници също могат да бъдат използвани като седимент за изпитванията или за отглеждане (3). Ако обаче се използва естествен седимент, той следва да бъде характеризирани най-малко по отношение на произход (място, от което е взет), рН и амоняк във водата между частиците на седимента, общо

▼ M6

съдържание на органичен въглерод и съдържание на азот, зърнометричен състав (процент на пясък, прах и глина) и процент на съдържание на вода (7), и той трябва да не съдържа никакво замърсяване и други организми, които биха могли да се конкурират с изпитваните организми или за които изпитваните организми да са жертви. Измерването на редокси потенциала и на катионообменния капацитет не е задължително. Препоръчва се също така преди добавянето на изпитвания химикал естественият седимент да бъде аклиматизиран в продължение на седем дни при същите условия, които ще преобладават при последващото провеждане на изпитване. В края на този период за аклиматизация водата над седимента следва да се отстрани и изхвърли.

26. Седиментът, който ще се използва, трябва да е с качество, което да позволява преживяването и размножаването на контролните видове за периода на експозицията, без същите да показват необичаен външен вид или поведение. Червеите от контролните групи трябва да могат да се заравят в седимента и да поглъщат седимент. Размножаването в контролите трябва да е в съответствие най-малко с критериите за валидност, както са описани в точка 13. Наличието или отсъствието на фекални пелети по повърхността на седимента, които показват поглъщане на седимент от червеите, следва да бъдат записвани и могат да бъдат от полза при интерпретирането на резултатите от изпитването по отношение на начините на експозиция. Допълнителна информация за поглъщане на седимент може да бъде получена чрез използването на методи, описани в (24), (25), (44) и (45), в които се уточняват поглъщането на седимент или изборът на частици при изпитваните организми.
27. Процедурите по боравене с естествени седименти преди употреба в лабораториите са описани в (3), (7) и (12). Приготвянето и съхранение на изкуствения седимент, препоръчан за използване в изпитването с *Lumbriculus*, е описан в допълнение 4.

Прилагане на изпитвания химикал

28. Изпитваният химикал следва да се добави към седимента. Тъй като се очаква повечето изпитвани химикали да имат малка разтворимост във вода, те следва да се разтворят в подходящ органичен разтворител (например ацетон, n-хексан, циклохексан) в обеми, които са възможно най-малки, с цел подготовка на изходния разтвор. Изходният разтвор следва да се разрежи със същия разтворител за приготвяне на разтворите за изпитване. Токсичността и летливостта на разтворителя, а също и разтворимостта на изпитвания химикал в избрания разтворител следва да са главните критерии за избор на подходящо средство за повишаване на разтворимостта. За всяко равнище на концентрация трябва да бъде използван същият обем на съответстващия разтвор. Седиментът трябва да се добави изцяло за всяко равнище на концентрация, за да се сведе до минимум варирането на концентрацията на изпитвания химикал между повторенията. След това всеки от изпитваните разтвори се смесва с кварцов пясък, както е описано в точка 22 (напр. 10 g кварцов пясък за всеки съд за изпитване). За пълното потапяне на кварцовия пясък за достатъчен се счита обем от 0,20—0,25 ml на g пясък. След това разтворителят се изпарява до сухо. С цел да се сведат до минимум загубите чрез съизпарение на изпитвания химикал (напр. в зависимост от парното налягане на химикала) пясъкът с покритието следва да бъде използван незабавно след сушенето. Сухият пясък се смесва с необходимото количество формулиран седимент от съответното равнище на концентрация. Количеството пясък, добавен чрез сместа изпитван химикал—пясък, трябва да се вземе предвид при приготвянето на седимента (т.е., седиментът трябва следователно да се приготвя с по-малко количество пясък). Основното предимство на тази процедура е, че почти не се въвежда разтворител в седимента (7). Като алтернатива, например за събран в полеви условия седимент, изпитваният химикал може да се прибави чрез добавяне в част от седимента, изсушена и фино стрита, както е описано по-горе за кварцовия пясък, или чрез размесване на изпитвания химикал с влажния седимент с последващо изпаряване на евентуалното средство за повишаване на разтворимостта. Трябва да се внимава изпитваният химикал, добавен към седимента, да бъде старателно и равномерно разпределен в целия му обем. Ако е необходимо, може да се анализират подпроби за потвърждаване на целевите концентрации в седимента и за определяне степента на хомогенност. Също така може да бъде полезно да се анализират подпроби от изпитваните разтвори за потвърждаване на целевите концентрации в седимента. Тъй като се използва разтворител за нанасяне на покритие от

▼ M6

изпитвания химикал върху кварцов пясък, следва да бъде използвана контрола на разтворител, която се приготвя със същото количество разтворител като изпитваните седименти. Методът, използван за добавяне на химикала, и аргументите за избор на конкретна процедура за добавяне, ако са различни от описаните по-горе, следва да бъдат протоколирани. Методът за добавяне може да бъде адаптиран към физичните и химичните свойства на изпитвания химикал, например за избягване на дължащи се на летливост загуби при добавяне или достигане на равновесие. Допълнителни насоки относно процедурите за добавяне се съдържат в „Environment Canada (1995)“ (46).

29. След като седиментът с добавка е приготвен, разпределен по съдовете за повторенията и злят с водата за изпитването, желателно е да се даде възможност за разпределение на изпитвания химикал от седимента във водната фаза (напр. (3) (7) (9)). За препоръчване е това да стане при температурата и аерирането, използвани при изпитването. Подходящото време за установяване на равновесие зависи от седимента и химикалите и може да варира от няколко часа до дни, дори до няколко (4—5) седмици в редки случаи (напр. (27)(47)). В това изпитване не се чака до достигане на равновесие, но се препоръчва период за достигане на равновесие от 48 часа до 7 дни. По този начин времето за разграждане на изпитвания химикал ще бъде сведено до минимум. В зависимост от целта на изследването, например когато трябва да се симулират условията в околната среда, седиментът с добавката може да се остави за по-дълъг период с оглед достигане на равновесие или зреене.
30. В края на този период за достигане на равновесие трябва да се вземат проби поне от водата над седимента, както и цялостно от седимента, най-малко при най-високата и при една по-ниска концентрация, за анализ на концентрацията на изпитвания химикал. Посочените аналитични определяния на изпитвания химикал следва да дадат възможност за изчисляване на масовия баланс и за изразяване на резултатите въз основа на измерените начални концентрации. Като цяло вземането на проби нарушава или разрушава системата седимент-вода. Следователно обикновено не е възможно да се използват същите повторения за вземане на проби от седимента и за червеи. Трябва да бъдат приготвени допълнителни „аналитични“ съдове с подходящи размери, които да бъдат третирани по същия начин (включително наличието на организми за изпитването), но които не се използват за биологични наблюдения. Размерите на съда следва да бъдат избрани така, че да се получат количествата от проби, изисквани от метода за анализ. Подробности за пробовземането са дадени в точка 53.

ПРОВЕЖДАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

Предварително изпитване

31. Ако няма налична информация за токсичността на изпитвания химикал за *Lumbriculus variegatus*, може да е полезно да се извърши предварителен опит с цел определяне на диапазона от концентрации, които да се изпитат в окончателното изпитване, и оптимизирне на условията на изпитването при окончателното изпитване. За тази цел се използва поредица от концентрации на изпитвания химикал, в която те са много раздалечени една от друга. Червеите се експонират на всяка една концентрация на изпитвания химикал за даден период от време (например 28 дни, както при окончателното изпитване), което позволява оценяване на подходящите концентрации за изпитването; не са необходими повторения. Поведението на червеите, например избягването на седимента, което може да се дължи на изпитвания химикал и/или на седимента, следва да се наблюдава и записват по време на предварителното изпитване. Концентрации над 1 000 mg/kg сухо тегло на седимента следва да не се изпитват при предварителните изпитвания.

Окончателно изпитване

32. При окончателното изпитване следва да се използват най-малко пет концентрации, които следва да се избераат въз основа на резултатите от предварителното изпитване за определяне на обхвата (точка 31) и както е описано в параграфи 35, 36, 37 и 38.

▼ **M6**

33. В допълнение към изпитваната поредица се изпитва и контрола (за повторенията вж. точки 36, 37 и 38), съдържаща всички съставки, с изключение на изпитвания химикал. Ако за прилагане на изпитвания химикал е използвано средство за повишаване на разтворимостта, то следва да не оказва значително въздействие върху изпитваните организми, което се изяснява от допълнителна контрола само с разтворител.

Планиране на изпитването

34. 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 червеите, добавени във всеки съд. В точки 35, 36, 37 и 38 са описани планове на изпитване за оценка на EC_{x_0} , за оценка на NOEC и за провеждане на гранично изпитване.
35. Концентрацията, при която се проявява въздействие (напр. EC_{50} , EC_{25} , EC_{10}), и диапазонът от концентрации, над който въздействието на изпитвания химикал е от значение, следва да бъдат обхванати от концентрациите, включени в изпитването. Следва да се избягват екстраполации за стойности, много по-ниски от най-ниската концентрация на въздействие или по-високи от най-високата концентрация на изпитване. Ако в изключителни случаи се прави подобна екстраполация, трябва да се даде пълно обяснение в протокола.
36. Ако трябва да се направи оценка на EC_x , следва да се направи изпитване при най-малко пет концентрации и минимум по три повторения за всяка концентрация; препоръчват се шест повторения за контролата или, ако се използва, за контролата на разтворител, за да се подобри оценката на варирането на контролата. Във всички случаи, препоръчва се да се използват достатъчно стойности на концентрациите на изпитване, за да е възможна удовлетворителна оценка чрез модела. Кратността между концентрациите не бива да бъде по-голяма от две (може да се направи изключение в случаите, в които кривата на зависимостта концентрация-отклик има твърде слаб наклон). Броят на повторенията за всяко третиране може да се намали, ако се увеличи броят на изпитваните концентрации с отклик в интервала от 5 – 95 %. Увеличаването на броя на повторенията или съкращаването на интервала между концентрациите обикновено води до стесняване на доверителния интервал на изпитването.
37. Ако се прави оценка на стойностите на NOEC/LOEC, препоръчват се най-малко пет концентрации на изпитване с най-малко четири повторения (препоръчват се шест повторения за контролата или, ако се използва, за контролата на разтворител, за да се подобри оценката на варирането на контролата), като кратността между стойностите на концентрациите не бива да е по-голяма от две. Известна информация за статистическата мощност, установена по време на тестването на хипотезите в кръговото изпитване на метода за изпитване, е дадена в допълнение 6.
38. Може да се предприеме гранично изпитване (с една концентрация за изпитване и контроли), ако не се очаква наблюдаване на въздействие нагоре до 1 000 mg/kg сухо тегло на седимент (напр. от предварително изпитване за определяне на обхвата), или ако изпитване при една концентрация ще бъде достатъчно, за да се потвърди представляваща интерес стойност на NOEC. В последния случай в протокола от изпитването трябва да бъде включена подробна обосновка за избора на пределна концентрация. Предназначението на граничното изпитване е да се извърши изпитване при достатъчно висока концентрация, така че да се позволи на лицата, взимаша решения, да отхвърлят възможно токсично въздействие на изпитвания химикал, 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 третираните проби, така и на контролите. Известна информация за статистическата мощност, установена по време на тестването на хипотезите в кръговото изпитване на метода за изпитване, е дадена в допълнение 6.

Условия на експозиция*Изпитвани организми*

39. Изпитването се извършва с най-малко 10 червея за всяко повторение, използвано за определяне на биологичните параметри. Броят на червеите съответства приблизително на 50—100 mg влажна биомаса. При допускане за сухо съдържание от 17,1 % (48), това води до приблизително 9—17 mg

▼ M6

суха биомаса за съд. ЕРА на САЩ (2000 (7)) препоръчва на степен на зареждане не по-голяма от 1: 50 (суха биомаса: ТОС). За формулирания седимент, описан в точка 22, това съответства на около 43 g седимент (сухо тегло) на 10 червея при съдържание на ТОС от 2,0 % от сухия седимент. В случаите, в които се използват повече от 10 червея на съд, количеството на седимента и на водата над седимента следва да бъде съответно коригирано.

40. Всички червеи, използвани в дадено изпитване, следва да идват от един и същ източник, и да бъдат индивиди със сходен физиологичен статус (вж. допълнение 5). Следва да бъдат избрани червеи със сходен размер (вж. точка 39). Препоръчва се преди изпитването да се претегли подпроба от партидата или запаса от червеи, за да се оцени средното тегло.
41. Червеите, които трябва да се използват при дадено изпитване, се отстраняват от културата (вж. допълнение 5 за повече подробности). Големите (полово зрели) животни, които не показват признаци на неотдавнашно разкъсване, се прехвърлят в стъклени блюда (напр. блюда на Петри), съдържащи чиста вода. Впоследствие те се синхронизират, както е описано в допълнение 5. След регенериране за период от 10 до 14 дни за изпитването следва да се използват интактните цели червеи със сходен размер, които активно плават или пълзят след лек механичен стимул. Ако условията на изпитването се различават от условията на отглеждането (например температура, режим на осветление и вода над седимента), фаза от напр. 24 h при същите като изпитването температура, режим на осветление и вода над седимента следва да е достатъчна за адаптирането на червеите към условията на изпитване. Адаптираните олигохети следва да се разпределят на случаен принцип в съдовете за изпитване.

Хранене

42. Тъй като храна се добавя към седимента преди (или по време на) прилагането на изпитвания химикал, червеите не се захранват допълнително по време на изпитването.

Светлина и температура

43. Продължителността на излагане на светлина в културата и при изпитването обикновено е 16 часа (3), (7). Интензитетът на светлината трябва да бъде поддържан нисък (напр. 100-500 lx), за да се симулират естествените условия на повърхността на седимента, и се измерва поне веднъж по време на периода на експозиция. Температурата трябва да бъде $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ по време на цялото изпитване. Разликата в температурите между съдовете за изпитване, измерена на зададена дата, трябва да не е по-висока от $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Съдовете за изпитване следва да се поставят в инкубатора за изпитване или в зоната за изпитване на случаен принцип, например с цел да се сведе до минимум изместването на стойностите на размножаването, дължащо се на местоположението на съда.

Аериране

44. Водата над седимента в съдовете за изпитване следва леко да се аерира (напр. 2-4 мехурчета в секунда) с помощта на пипета „Пастър“, разположена на приблизително 2 cm над повърхността на седимента, за да се ограничи максимално нарушаването на седимента. Следва да се вземат мерки концентрацията на разтворения кислород да не се понижава под 30 % от стойността на насищането с разтворен въздух (ASV). Снабдяването с въздух следва да се контролира и, ако е необходимо, да се коригира поне веднъж на ден в работните дни.

Измерване на качеството на водата

45. Във водата над седимента трябва да се измерват следните параметри за качество на водата:

Температура:	поне в един съд за изпитване на всяко равнище на концентрация и в един съд за изпитване от контролите веднъж седмично и в началото и в края на периода на експозиция; Ако е възможно, температурата в заобикалящата среда (въздух от околната среда или водна баня) може да се записва допълнително, напр. на всеки час;
--------------	--

▼ M6

Съдържание на разтворения кислород:	на	поне в един съд за изпитване на всяко равнище на концентрация и в един съд за изпитване от контролите веднъж седмично и в началото и в края на периода на експозиция; изразено като mg/l и стойността на ASV (%);
Снабдяване въздух:	с	следва да бъде контролирано поне веднъж на ден в работните дни и, ако е необходимо, коригирано;
pH:		поне в един съд за изпитване на всяко равнище на концентрация и в един съд за изпитване от контролите веднъж седмично и в началото и в края на периода на експозиция;
Обща твърдост на водата:		най-малко в едно повторение на контролите и в един съд за изпитване при най-високата концентрация в началото и в края на периода на експозиция; изразена като mg/l CaCO ₃ ;
Общо съдържание на амоняк:		най-малко в едно повторение на контролите и в един съд за изпитване за всяка концентрация в началото на периода на експозиция, и впоследствие 3 пъти в седмицата; изразено като mg/l NH ₄ ⁺ или NH ₃ или общо азот от амоняк.

Ако измерването на параметри за качество на водата изисква отстраняване на значителни водни проби от съдовете, може да е препоръчително да се приготвят отделни съдове за измерванията на качеството на водата, така че да не се променя обемното съотношение на водата към седимента.

Биологични наблюдения

46. По време на експозицията съдовете за изпитване следва да бъдат наблюдавани, за да се оценят визуално всякакви разлики в поведението при червеите (напр. избягване на седимента, фекални пелети, видими върху повърхността на седимента) в сравнение с контролите. Наблюденията следва да се записват.
47. В края на изпитването всяко повторение се изследва (допълнителните съдове, определени за химични анализи, могат да бъдат изключени от разглеждането). Трябва да се използва подходящ метод за обратно извличане на всички червеи от съда за изпитване. Следва да се вземат мерки всички червеи да бъдат извлечени без наранявания. Един от възможните методи е пресяване на червеите от седимента. Може да се използва мрежа от неръждаема стомана с подходящ размер на отворите. По-голямата част от водата над седимента се отделя внимателно, а оставащите седимент и вода се разбъркват до каша, която може да премине през ситото. При използване на отвори с размер 500 µm повечето от частиците на седимента преминават много бързо през ситото; независимо от това, пресяването следва да се извърши бързо, за да се не се допусне пълзене на червеите в ситото или през него. При използване на отвори с размер 250 µm се предотвратява пълзенето на червеите в ситото или през него; Независимо от това следва да се внимава колкото е възможно по-малко частици от седимента да се задържат върху мрежата. Пресятата каша от всеки съд с повторение може да бъде прекарана през сито за втори път, за да се гарантира, че са извлечени всички червеи. Алтернативен метод би могъл да бъде затоплянето на седимента чрез поставяне на съдовете за изпитване във водна баня при температура 50—60 °C; червеите напускат седимента и могат да бъдат събрани от повърхността на седимента с използване на пипета с широк отвор с огнева полировка. Друг алтернативен метод би могъл да бъде изготвянето на каша от седимент и поставянето на тази каша в плитко блюдо с подходящ размер. От плиткия слой на кашата червеите могат да бъдат взети със стоманена игла или часовникарска пинсета (която следва да се използва по-скоро като вилица, отколкото като щипци, за да се избегне нараняването на червеите) и прехвърлени в чиста вода. След отделяне на червеите от кашата от седимент, те се измиват в средата за изпитване и се преброяват.
48. Независимо от използвания метод, лабораториите следва да докажат, че техният персонал е в състояние да извлече обратно най-малко средно 90 % от организмите от цялото количество седимент. Например,

▼ **M6**

определен брой от изпитвани организми може да се добави към седимент в контрола или към изпитван седимент, и извличането би могло да се определи след 1 час (7).

49. Общият брой на живите и мъртви индивиди на повторение трябва да бъде записан и оценен. Следните групи от червеи се смятат за мъртви:

- a) няма реакция след лек механичен стимул
- б) има признаци за разлагане (в съчетание с „a“)
- в) брой на липсващите червеи

Освен това, живите червеи могат да бъдат причислени към една от следните три групи:

- a) големи цели червеи (полово зрели) без регенерирани части на тялото
- б) цели червеи с регенерирани, по-светло оцветени телесни зони (т.е. с нова задна част, с нова предна част, или с нови и задна, и предна част)
- в) разкъсани червеи (т.е. наскоро разкъсани червеи с нерегенерирани телесни зони)

Тези допълнителни наблюдения не са задължителни, но могат да бъдат използвани за допълнително тълкуване на биологичните резултати (например, голям брой червеи, причислени към група „С“, може да означава забавяне на размножаването или регенерация при дадено третиране). Освен това, ако се наблюдават разлики във външния вид (напр. увреждания на външната обвивка, едематозни участъци от тялото) между третираните и контролните червеи, те следва да бъдат записани.

50. Незабавно след преброяването/оценката, живите червеи, открити във всяко повторение, се прехвърлят върху изсушени, предварително претеглени и етикетирани блюда за теглене (по едно за всяко повторение), и се умъртвяват с помощта на една капка етанол на блюдо за теглене. Блюдата за теглене се поставят в пещ за сушене при 100 ± 5 °C, за изсушаване през нощта, след което се претеглят след охлаждане в сушилня, и се определя сухото тегло на червеите (за предпочитане в г, с точност май-малко 4 знака след десетичната запетая).
51. В допълнение към общото сухо тегло, сухото тегло без пепел може да бъде определено както е описано в (49), за да се отчетат произхождащите от погълнатия седимент неорганични съставки, налични в храносмилателния тракт на червеите.
52. Биомасата се определя като обща биомаса за повторение, включително полове зрелите и новородените червеи. Мъртвите червеи не следва да се вземат предвид за определяне на биомасата в едно повторение.

Проверка на концентрацията на изпитвания химикал

Пробовземане

53. Проби за химичен анализ на изпитвания химикал следва да се вземат като минимум при най-високата и при една по-ниска концентрация, най-малко в края на фаза на достигане на равновесие (преди добавянето на изпитваните организми) и в края на изпитването. Трябва да се вземат проби за анализ най-малко от самия седимент и от водата над него. На всяка дата на вземане на пробата следва да се вземат най-малко по две проби от всяка матрица и от всяко третиране. Една от пробите от повторението може да се съхранява като резервна (за анализ например в случай, че първоначалният анализ попадне извън диапазона ± 20 % от номиналната концентрация). В случай на специфични химически свойства, например ако се очаква бързо разграждане на

▼ **M6**

изпитвания химикал, графикът за анализа може да се прецизира (напр. по-често вземане на проби, анализ на повече равнища на концентрация) въз основа на експертна преценка. В такъв случай пробите могат да се вземат на междинни дати за вземане на проби (напр. на ден седми след началото на експозицията).

54. Проби от водата над седимента следва да се вземат чрез внимателно декантиране или източване със сифон на водата над седимента, така че да се сведе до минимум нарушаването на седимента. Записват се обемите на взетите проби.
55. След като водата над седимента е отстранена, седиментът се хомогенизира и се прехвърля в подходящ съд. Теглото на пробата от влажния седимент се записва.
56. Ако в допълнение се изисква анализ на изпитвания химикал във водата между частиците на седимента, хомогенизираните и претеглените проби от седимента трябва да се центрофугират за получаване на водата между частиците на седимента. Например, около 200 ml влажен седимент може да се напълни в 250 ml бехерови чаши за центрофугиране. След това пробите следва да се центрофугират без филтруване, за да се изолира водата между частиците на седимента, например на $10\,000 \pm 600 \times g$ за 30—60 min. при температура, не по-висока от температурата, при която се провежда изпитването. След центрофугирането супернатантната течност се декантира или се отстранява с пипета, като се внимава да не се въвеждат частици седимент, и обемот се записва. Теглото на оставащия седимент се записва. Определянето на сухото тегло на седимента на всяка дата на пробовземане може да улесни оценката на масовия баланс или аналитичния добив на изпитвания химикал в системата вода-седимент. В някои случаи може да не е възможно да се анализират концентрациите във водата между частиците на седимента, тъй като пробата е с много малък размер.
57. Ако не се извършват незабавни анализи, пробите следва да се съхраняват с помощта на подходящ метод, напр. при условията за съхранение, препоръчани за минимално разграждане на конкретния изпитван химикал (напр. пробите от околната среда обикновено се съхраняват при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ на тъмно). Информация за правилните условия за съхранение на конкретния изпитван химикал — например продължителност и температура на съхранение, процедури за екстракция и др. — следва да бъде получена преди започването на изследването.

Метод за анализ

58. Понеже цялата процедура се обуславя по същество от точността, прецизността и чувствителността на метода за анализ, използван за изпитвания химикал, проверява се експериментално дали прецизността и възпроизводимостта на химичния анализ, а също и аналитичният добив на изпитвания химикал от водата и седимента, са задоволителни за конкретния метод най-малко при най-ниската и при най-високата концентрация на изпитване. Следва да се провери също така дали изпитвания химикал не е откриваем в контролните камери в концентрации, които са по-високи от границата за количествено определяне. Ако е необходимо, номиналните концентрации за аналитичния добив в пробите за качествен контрол с добавка (напр. в случаите, в които аналитичният добив е извън 80-120 % от добавеното количество) се коригират. По време на изпитването 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).
59. Аналитичният добив на изпитвания химикал, границата на количествено определяне и границата на откриване в седимента и водата следва да се записват и протоколират.

ДАНИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Обработка на резултатите

60. Основните задължителни зависими величини при изпитването, които трябва да бъде оценени от статистическа гледна точка, са биомасата и общият брой червеи на повторение. По избор могат също да бъдат оценени размножаването (като увеличение на броя на червеите) и растежът (като увеличение на сухата биомаса). В този случай следва да се получи оценка на сухото тегло на червеите в началото на експозицията, например, чрез измерване на сухото тегло на представителна подпроба от партидата на синхронизирани червеи, които ще се използват за изпитването.

▼ M6

61. Въпреки че смъртността не представлява крайна точка на това изпитване, тя следва да се оцени в максималната възможна степен. С цел да се изчисли смъртността, броят на червеите, които не реагират на лек механичен стимул или показват признаци на разграждане, както и липсващите червеи, следва да се смятат за мъртви. Смъртността трябва като минимум поне да се записва и да се взема под внимание, когато се интерпретират резултатите от изпитването.
62. Концентрациите, оказващи въздействие, следва да бъдат изразени в mg/kg сухо тегло на седимента. Ако аналитичният добив на изпитвания химикал, измерен в седимента, или в седимента и водата над седимента в началото на експозицията, е между 80 и 120 % от номиналните концентрации, концентрациите, оказващи въздействие (EC_x , NOEC, LOEC), могат да бъдат изразени въз основа на номиналните концентрации с повече от $\pm 20\%$ от тях, концентрациите, оказващи въздействие (EC_x , NOEC, LOEC) следва да се основават на първоначално измерените концентрации в началото на експозицията, например като се отчита масовият баланс на изпитвания химикал в системата за изпитване (вж. точка 30). В тези случаи допълнителна информация може да се получи от анализа на изходните и/или прилаганите разтвори, за да се потвърди дали изпитваните седименти са приготвени правилно.

 EC_x

63. Стойностите на EC_x за описаните в точка 60 параметри се изчисляват с помощта на подходящи статистически методи (например пробит-анализ, логистична функция или функция на Вейбул, метод на Спирмън-Карбър с изключване на данни, или обикновена интерполация). Указания за статистическото оценяване са дадени в (15) и (50). Стойност на EC_x се получава чрез добавяне на стойност, съответстваща на $x\%$ от средната стойност на контролна проба в уравнението. За изчисляване на EC_{50} или всяка друга стойност EC_x , средните стойности от всяко третиране (\bar{X}) следва да бъдат подложени на регресионен анализ.

NOEC/LOEC

64. Ако със статистическия анализ се цели определяне на NOEC/LOEC, необходими са статистики за всеки отделен съд (индивидуалните съдове се разглеждат като повторения). Следва да се приложат подходящи статистически методи. По принцип неблагоприятните въздействия на изпитвания обект в сравнение с контролата се проучват чрез проверяване на (по-малката) едностранна хипотеза при $p \leq 0,05$. Примери са дадени в следващите точки. Указания за избора на подходящи статистически методи са дадени в (15) и (50).
65. Нормалността на разпределението на данните може да се тества например с тест на Колмогоров-Смирнов за качество на апроксимацията, тест с тестова статистика отношението на размаха към стандартното отклонение (R/s-тест) или тест на Шапиро-Уилк (двустранен, $p \leq 0,05$). За тестване на хомогенността на дисперсията могат да се използват тест на Кокрън, тест на Левин или тест на Бартлет, (двустранен, $p \leq 0,05$). Ако са изпълнени критериите за използване на параметрични тестови процедури (нормалност, хомогенност на дисперсията), могат да се извършат еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA) и последващи множествени сравнения. За изчисляване дали са налице статистически значими разлики ($p \leq 0,05$) между контролите и различните концентрации на изпитваните обекти могат да се използват сравнения по двойки (например t-тест на Дънет) или трендови тестове със стъпка назад (напр. тест на Уйлямс). В противен случай за определяне на NOEC и LOEC следва да се използват непараметрични методи (напр. U-тест на Бонферони по Holm или трендов тест на Йонкхере-Терпстра).

Гранично изпитване

66. Ако е извършено гранично изпитване (сравнение на контрола и само на едно третиране) и са изпълнени критериите за използване на параметрични тестови процедури (нормалност, хомогенност), метричните отклици (общ брой червеи и биомаса, изразена като сухо тегло на червеите) могат да бъдат оценени чрез тест на Стюдънт (t-тест). Ако тези критерии не са изпълнени, може да се използва t-тест за нееднаква дисперсия (t-тест на Уелч) или непараметричен тест, напр. U-тест на Ман-Уитни. Известна информация за статистическата мощност, установена по време на тестването на хипотезите в кръговото изпитване на метода, е дадена в допълнение 6.

▼ **M6**

67. За установяване на значими разлики между контролите (контрола и контрола на разтворител), повторенията на всяка контрола могат да се изпитват както е описано при граничното изпитване. Ако при тези изпитвания не бъдат установени значими разлики, всички повторения на контроли и контроли на разтворител могат да бъдат обединени. В противен случай всички третирания следва да бъдат сравнявани с контролата на разтворител.

Интерпретиране на резултатите

68. Резултатите трябва да се интерпретират с внимание, ако са налице отклонения от настоящия метод за изпитване и когато измерените концентрации на изпитване са на равнища, близки до границата на откриване на метода за анализ. Всички отклонения от настоящия метод за изпитване трябва да се отбележат.

Протокол от изпитването

69. Протоколът от изпитването следва да включва най-малко следната информация.

— *Изпитван химикал:*

— 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 изпитвания химикал, източник на изпитвания химикал, идентичност и концентрация на използвания разтворител, ако има такъв;

— всяка налична информация относно физичната природа и физичните и химичните свойства, получена преди започване на изпитването (напр. разтворимост във вода, парно налягане, коефициент на разпределение в почвата (или в седимент, ако такава информация е налице), $\log K_{ow}$, стабилност във вода и др.);

— *Изпитван вид:*

— научно наименование, източник и всякакво предварително третиране, аклиматизация, условия на отглеждане и т.н.

— *Условия на изпитване:*

— използвана процедура на изпитване (напр. статична, полустатична или проточна);

— планиране на изпитването (например брой, материал и размер на камерите за изпитване, обем на водата на съд, маса и обем на седимента на съд, (за проточна или полустатична процедури: скорост на подмяна на обема вода), всякакво аериране, използвано преди и по време на изпитването, брой на повторенията, брой червеи на повторение в началото на експозицията, брой на концентрациите на изпитване, продължителност на кондиционирането, времена на достигане на равновесие и на експозиция, честота на пробовземането);

— дълбочина на седимента и на водата над седимента;

— Метод за предварителна обработка и добавяне/прилагане на изпитвания химикал;

— номиналните концентрации на изпитване, подробности относно вземане на проби за химичен анализ, както и методите за анализ, чрез които са получени концентрациите на изпитвания химикал;

— характеристики на седиментите, както е описано в точки 24—25, и всички други направени измервания; приготвяне на формулиран седимент;

— приготвяне на водата за изпитването (ако се използва възстановена вода) и характеристики на водата (концентрация на кислород, рН, проводимост, твърдост и всички други направени измервания) преди началото на изпитването;

— подробна информация за храненето, включително вида на храната, приготвянето, количеството и режима на хранене;

▼ M6

- Интензитет на светлината и времетраене на осветлението;
 - методите, използвани за определяне на всички биологични параметри (например вземане на проби, проверка, измерване теглото на изпитваните организми) и всички абиотични параметри (напр. параметри на качеството на водата и седимента);
 - обеми и/или тегла на всички проби за химичен анализ;
 - подробна информация за третирането на всички проби за химичен анализ, включително подробности за изготвяне, съхранение, процедури на добавяне, екстракция и процедури за анализ (и прецизност) за изпитвания химикал, както и аналитичен добив на изпитвания химикал.
- *Резултати:*
- качество на водата в съдовете за тестване (рН, температура, концентрация на разтворен кислород, твърдост, концентрации на амоняк и всякакви други направени измервания);
 - общ органичен въглерод (ТОС), отношението на сухото тегло към влажното тегло, рН на седимента, и всякакви други направени измервания;
 - общ брой и, ако е определен, брой цели и разкъсани червеи във всяка камера за изпитване в края на изпитването;
 - сухо тегло на червеите във всяка камера за изпитване в края на изпитването и, ако е измерено, сухо тегло на подпроба от червеите в началото на изпитването;
 - всякакво наблюдавано аномално поведение в сравнение с контролите (напр. избягване на седимента, наличие или отсъствие на фекални пелети);
 - всякаква наблюдавана смъртност;
 - оценки на стойностите на крайни точки за токсичността (напр. ЕС_x, LOEC и/или NOEC), както и статистическите методи, използвани за тяхното определяне;
 - номиналните концентрации на изпитване, измерените концентрации на изпитване и резултатите от всички анализи за определяне на концентрацията на изпитвания химикал в съдовете за изпитване;
 - всякакви отклонения от критериите за валидност.
- *Оценка на резултатите:*
- съответствие на резултатите с критериите за валидност, изброени в точка 13,
 - обсъждане на резултатите, включително всякакво влияние върху резултата от изпитването, вследствие на отклонения от настоящия метод за изпитване.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) EC (2003). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I — IV. Office for Official Publications of the EC (European Commission), Luxembourg.
- (2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

▼ M6

- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (6) Глава В.27 от настоящото приложение, „Изпитване за токсичност за хирономиди в система вода–седимент с използване на седимент с добавка“.
- (7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (8) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.
- (9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).
- (10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streløkke and H.Köpp. Berlin 1995.
- (11) Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.
- (12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.
- (13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/
- (16) Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.
- (17) Baily H.C., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

▼ M6

- (18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & Scheuerman P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. *Environmental Toxicology*. 14(2): 271-278.
- (19) Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 133:99-109.
- (20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 12(7):1261-1266.
- (21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. *Hydrobiol.* 262:57-63.
- (22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1885-1894.
- (23) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (24) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (25) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg, M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 292-302.
- (27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 872-885.
- (29) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ¹⁴C-17 α -ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. *Chemosphere* 59, 271-280.
- (31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chemistry*, Vol. 20, pp. 2000–2007.
- (32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

▼ M6

- (33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
- (34) Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 235/236: 407-414.
- (35) Drewes C.D. & Fournier C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. *Develop. Biol.* 138: 94-103.
- (36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No.* 22.
- (37) Глава В.1 от настоящото приложение, Изпитване за остра токсичност при риби
- (38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.
- (39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. *Chemosphere* 35, 835-852.
- (40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety*, 39, 10-20.
- (41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes“, 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (42) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- (43) Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere* 31: 3291-3303.
- (44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.
- (45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology* 8, 111-124.
- (46) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Technol.* 23, 588-595.
- (48) Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J. & Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 223-228.
- (49) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1244-1249.

▼ **M6**

- (50) OECD 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris, France.
- (51) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

Допълнителна литература по статистическите процедури:

- Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.
- Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.
- Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.
- Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.
- Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York.
- Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591-611.
- Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.
- Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

▼ **M6***Допълнение 1***Определения**

За целите на настоящия метод за изпитване са използвани следните определения:

Химикал означава вещество или смес.

Периодът на кондициониране се използва за стабилизиране на микробния компонент на седимента и за отстраняване, например, на амонияк с произход от съставки на седимента; той е преди добавянето на изпитвания химикал към седимента. Обикновено след кондиционирането водата над седимента се изхвърля.

ЕС_x е концентрацията на изпитвания химикал в седимента, която води до въздействие от x % (например 50 %) върху биологичен параметър в рамките на определен период на експозиция.

Периодът за достигане на равновесие се използва, за да се даде възможност за разпределение на изпитвания химикал между твърдата фаза, водата между частиците на седимента и водата над седимента; той е след добавянето на изпитвания химикал към седимента и преди добавянето на изпитваните организми.

Фазата на експозиция е времето, през което изпитваните организми са експонирани на изпитвания химикал.

Формулиран седимент или възстановен, изкуствен или синтетичен седимент, е смес от материали, използвани за симулиране на физичните съставки на естествения седимент.

Най-ниска концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC) е най-ниската изпитвана концентрация на изпитван химикал, при която за химикала се наблюдава значимо токсично въздействие (при $p \leq 0,05$) в сравнение с контролата. Независимо от това, всички изпитвани концентрации над LOEC трябва да имат вредно въздействие, равно или по-голямо от наблюдаваното при LOEC. Ако тези две условия не могат да бъдат удовлетворени, трябва да се даде пълно обяснение за това как е била избрана LOEC (и следователно NOEC).

Концентрацията без наблюдавано въздействие (NOEC) е изпитваната концентрация непосредствено под LOEC, която при сравнение с контролната няма статистически значимо въздействие ($p \leq 0,05$) в рамките на даден период на експозиция.

Коефициент на разпределение октанол-вода, K_{ow}, понякога изразяван също и като P_{ow}, е отношението на разтворимостите на химикала в p-октанол и във вода при достигнато равновесие и представлява липофилността на даден химикал (глава A.24 от настоящото приложение). K_{ow} или логаритъмът от K_{ow} (log K_{ow}) се използва като указание за потенциала на химикала за биоаккумуляция във водни организми.

Коефициент на разпределение органичен въглерод-вода (K_{oc}) е съотношението между концентрацията на химикала в/върху съдържащата органичен въглерод част от седимента и концентрацията на химикала във вода при достигнато равновесие.

Вода над седимента е водата, която покрива седимента в съда за изпитване.

Вода между частиците на седимента или интерстициална вода е водата, която заема пространството между частиците на седимента или на почвата.

Седимент с добавка е седимент, към който е добавен изпитван химикал.

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

▼ **M6***Допълнение 2***Състав на препоръчаната възстановена вода**

(възприет от глава В.1 от настоящото приложение (1))

а) *Разтвор на калциев хлорид*

В дейонизирана вода се разтварят 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; допълва се до 1 l с дейонизирана вода

б) *Разтвор на магнезиев сулфат*

В дейонизирана вода се разтварят 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; допълва се до 1 l с дейонизирана вода

в) *Разтвор на натриев бикарбонат*

В дейонизирана вода се разтварят 2,59 g NaHCO_3 ; допълва се до 1 l с дейонизирана вода

г) *Разтвор на калиев хлорид*

В дейонизирана вода се разтварят 0,23 g KCl ; допълва се до 1 l с дейонизирана вода

Всички химикали следва да са с квалификация „чист“.

Проводимостта на дестилираната или дейонизираната вода не следва да надвишава $10 \mu\text{Scm}^{-1}$.

25 ml от всеки от разтвори а)–г) се смесват и общият обем се допълва до 1 литър с дейонизирана вода. Сборът от калциевите и магнезиевите йони в тези разтвори е 2,5 mmol/l.

Съотношението на Са:Мг йони е 4:1, а на Na:К йони — 10:1. Алкалността на този разтвор до достигане на рН 4,3 ($\text{K}_{\text{S4.3}}$) е 0,8 mmol/l.

Водата за разреждане се аерира до насищане с кислород, след това се съхранява около два дни без допълнително аериране преди употреба.

ПОЗОВАВАНЕ

- (1) Глава В.1 от настоящото приложение, Изпитване за остра токсичност при риби.

▼ **M6***Допълнение 3***Физични и химични характеристики на приемлива вода за разреждане**

Съставка	Концентрации
Твърди частици	< 20 mg/l
Общ органичен въглерод	< 2 µg/l
Нейонизиран амоняк	< 1 µg/l
Остагъчен 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

(възприет от ОИСР (1992) (1))

ПОЗОВАВАНЕ

- (1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

▼ M6

Допълнение 4

Препоръчан изкуствен седимент — указания за приготвяне и съхранение

Съставки на седимента

Съставка	Характеристики	% седимент сухо тегло
Торф	Торф от торфен мъх, степен на разграждане: „средно“, изсушен на въздух, без видими остатъци от растения, фино смлян (размер на частиците $\leq 0,5$ mm)	$5 \pm 0,5$
Кварцов пясък	Размер на зърната: ≤ 2 mm, но > 50 % от частиците следва да бъдат в диапазон 50—200 μ m	75 — 76
Каолин	Съдържание на каолинит ≥ 30 %	20 ± 1
Източник на храна	напр. прах от <i>Urtica</i> (<i>Folia urticae</i>), листа от коприва (<i>Urtica dioica</i>), фино смляни (размер на частиците $\leq 0,5$ mm); в съответствие с аптечните стандарти, за консумация от човека в допълнение към сухия седимент	0,4 — 0,5 %
Органичен въглерод	Коригира се чрез добавяне на торф и пясък	$2 \pm 0,5$
Калциев карбонат	CaCO_3 , на прах, химически чист, в допълнение към сухия седимент	0,05 — 1
Дейониизирана вода	Проводимост ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$, в допълнение към сухия седимент	30—50

Бележка: Ако се очакват повишени концентрации на амоняк, например ако за изпитвания химикал е известно, че потиска нитрификацията, може да се окаже полезно 50 % от богатия на азот прах от *Urtica* да се заменят с целулоза (напр. α -целулоза на прах, химически чиста, размер на частиците $\leq 0,5$ mm; (1) (2)).

Приготвяне

Торфът се изсушава с въздух и се смилва на фин прах. Приготвя се суспензия от желаното количество торф на прах в дейониизирана вода, като се използва високопроизводително хомогенизиращо устройство. Стойността на рН на тази суспензия се коригира до $5,5 \pm 0,5$ с CaCO_3 . Суспензията се аклиматизира най-малко два дни при 20 ± 2 °C, като се разбърква леко, за да се стабилизира рН и да се установи стабилна микробна съставка. 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 дейониизирана 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_3 . Независимо от това, ако се очаква изменение в стойностите на амоняка, може да бъде полезно рН на седимента да се поддържа под 7,0 (например между 6,0 и 6,5). Вземат се проби от седимента, за да се определи сухото тегло и съдържанието на органичен въглерод. Ако се очаква изменение в стойностите на амоняка, формулираният седимент може да бъде кондициониран в продължение на седем дни при същите условия, които преобладават в последващото изпитване (напр. съотношение седимент—вода от 1: 4, височина на слоя седимент както в съдовете за изпитване), преди към него да бъде добавен изпитваният химикал, т.е.

▼ M6

следва към него да бъде добавена вода, която трябва да е аерирана. В края на периода за кондициониране водата над седимента следва да се отстрани и изхвърли. След това кварцовият пясък с добавка се смесва със седимента за всяко равнище на третиране, седиментът се разпределя по съдовете за повторенията и се залива с водата за изпитването. След дова съдовете се инкубират при същите условия, които преобладават в последващото изпитване. Оттук започва периодът на достигане на равновесие. Водата над седимента следва да бъде аерирана.

Избраният източник на храна следва да се добави преди или по време на добавянето на изпитвания химикал към седимента. Тя може първоначално да се смеси с торфената суспензия (вж. по-горе). Независимо от това, прекомерното разграждане на източника на храна преди да бъдат добавени изпитваните организми — например в случай на дълго време за достигане на равновесие — може да се избегне чрез поддържане на максимално кратък времеви интервал между добавянето на храната и началото на експозицията. За да се гарантира, че храната е с добавен изпитван химикал, източникът на храна следва да бъде смесен със седимента не по-късно от деня, в който изпитвания химикал се добавя към седимента.

Съхранение

Сухите съставки на изкуствения седимент могат да се съхраняват в сухо и хладно място, или при стайна температура. Приготвеният седимент с добавен изпитван химикал следва да се използва незабавно в изпитването. До анализа пробите от седимент с добавен химикал могат да се съхраняват при условията, препоръчани за конкретния изпитван химикал.

ПОЗОВАВАНИЯ

- (1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

▼ M6

Допълнение 5

Методи за отглеждане на *Lumbriculus variegatus*

Lumbriculus variegatus (Müller), Lumbriculidae, Oligochaeta обитава сладководни седименти и широко се използва при екотоксикологични изпитвания. Той може лесно да се отглежда в лабораторни условия. Кратко описание на методите за отглеждане е дадено по-долу.

Методи за отглеждане

Условията на отглеждане на *Lumbriculus variegatus* са подробно описани във Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). По-долу е дадено кратко резюме на тези условия. Основно предимство на *L. variegatus* е бързото му размножаване, водещо до бързо увеличаване на биомасата в отглеждани в лабораторни условия популации (напр. (1), (3), (4), (5)).

Червеите могат да бъдат отглеждани в големи аквариуми (57—80 l) при 23 °C, с времетраене на осветлението 16 L:8 D (100—1 000 lx), като се използва ежедневно подновявана природна вода (45—50 l на аквариум). Субстратът се приготвя чрез нарязване на ленти на салфетки от неизбелена кафява хартия, които могат впоследствие да бъдат смесени с вода за отглеждането за няколко секунди, за получаване на малки парчета хартиен субстрат. След това субстратът може да бъде пряко използван в аквариумите за отглеждане на *Lumbriculus* чрез покриване на дънната област на съда, или да се съхранява замразен в дейонизирана вода за по-късна употреба. Новият субстрат в съда обикновено е с трайност около два месеца.

Всяко отглеждане на червеи започва с 500—1 000 червея и се запазва с 10 ml суспензия, съдържаща 6 g стартерни фуражи за първоначално 3 пъти седмично в условия на прилагане на полустатичен или проточен метод. Скоростта на подаване на храната за статичните или полустатичните култури следва да бъдат по-малка, за да се предотврати развитието на бактерии и патогенни гъбички.

При тези условия броят на индивидите в културата по принцип се удвоява приблизително за 10 до 14 дни.

Като алтернатива, *Lumbriculus variegatus* също може да се отглежда в система, състояща се от слой от кварцов пясък, като използвания за изкуствения седимент (1—2 см дълбочина), и възстановена вода. Като съдове за отглеждане могат да се използват контейнери от стъкло или неръждаема стомана, с височина от 12 до 20 cm. Водното тяло следва леко да се аерира (напр. 2 мехурчета в секунда) с помощта на пипета „Пастър“, разположена на приблизително 2 cm над повърхността на седимента. За да се избегне натрупване, например на амоняк, водата над седимента следва да се обменя, като се използва проточна система, или ръчно поне веднъж седмично. Олигохетите могат да се държат при стайна температура със светъл период от 16 часа (интензитет 100-1 000 lx) и 8 часа тъмнина. При полустатичните култури (сменяне на водата веднъж седмично) червеите се хранят с TetraMin два пъти седмично (например 0,6-0,8 mg на cm² от площта на седимента), който може да се прилага като суспензия 50 mg TetraMin на ml дейонизирана вода.

Lumbriculus variegatus може да бъде отстранен от културите в отделна бехерова чаша, например чрез прехвърляне на субстрат с фина мрежа, или на организми с помощта на стъклена пипета с широк отвор с огнева полировка (приблизително 5 mm в диаметър). Ако заедно с това в тази бехерова чаша бъде прехвърлен субстрат, бехеровата чаша, съдържаща червеите и субстрата, се оставя за една нощ при проточни условия, което ще отстрани субстрата от бехеровата чаша, а червеите ще останат на дъното на съда. След това те могат да бъдат въведени в наскоро приготвени съдове за отглеждане, или да бъдат допълнително обработени за изпитването, както е посочено в (3) и (4), или по-долу.

Един въпрос, който следва да бъде разгледан критично при използването на *L. variegatus* в изпитвания със седимент, е начинът му на размножаване (архитомия или морфалаксис, напр. (6)). В резултат от това безполово размножаване се получават два фрагмента, които не се хранят в продължение на определен период от време, докато не регенерира частта откъм главата или опашката (напр. (7), (8)). Това означава, че при *L. variegatus* експозицията чрез поглъщане на замърсени седимент не е непрекъснат процес.

▼ **M6**

Поради това следва да се извърши синхронизация с цел свеждане до минимум на неконтролираното размножение и регенерация и следващото от това голямо вариране на резултатите от изпитването. Известно вариране може да се получи, когато някои от индивидите, които са се разделили на фрагменти и поради това не се хранят в продължение на определен период, са по-малко експонирани на изпитвания химикал в сравнение с другите индивиди, които не се разделят на фрагменти по време на изпитването (9), (10), (11). От 10 до 14 дни преди началото на експозицията червеите следва да бъдат изкуствено разделени на сегменти (синхронизация). За синхронизация следва да бъдат избрани големи (полово зрели) червеи, които, за предпочитане, не показват признаци на неотдавнашен морфалаксис. Тези червеи могат да бъдат поставени върху предметно стъкло в капка вода за отглеждане и им се извършва дисекция със скапел в средната част на тялото. Следва да се вземат мерки задните краища да са със сходен размер. След това задните краища се оставят, до началото на експозицията, за регенерация на нови глави в съд за отглеждане, съдържащ същия субстрат, като използвания при отглеждането, и възстановена вода. Има показания за регенерация на нови глави, когато синхронизираните червеи се заравят в субстрата (наличието на регенерирани глави може да бъде потвърдено чрез инспектиране на представителна подпроба с бинокулярен микроскоп). След това се очаква изпитваните организми да са със сходен физиологичен статус. Това означава, че когато по време на изпитването се извърши размножаване чрез морфалаксис в синхронизирани червеи, почти всички животни се очаква да бъдат еднакво експонирани на седимента с добавка. Храненето на синхронизираните червеи следва да се извърши веднага след като червеите започнат да се заравят в субстрата, или 7 дни след дисекцията. Режимът на хранене следва да бъде съпоставим с този при редовните култури, но може да е препоръчително синхронизираните червеи да се хранят със същия източник на храна, който ще се използва по време на изпитването. Червеите следва да се държат при температурата на изпитването, на 20 ± 2 °C. След регенерацията, за изпитването следва да се използват интактни цели червеи, които активно плават или пълзят след лек механичен стимул. Следва да се избягват наранявания или автотомия при червеите, напр. чрез обработка на тези червеи с използване на пипети с ръбове, полирани с огнева полировка, или с направени от неръждаема стомана клечки за зъби.

Източници на стартерни култури за *Lumbriculus variegatus* (адреси в САЩ, взети от (4))

Европа

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Germany

Bayer Crop Science AG
Development — Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Germany

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finland

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydro-
wissenschaften
Mommstr. 13
D-01062 Dresden
Germany

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

САЩ

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

▼ M6

U.S. Environmental Protection Agency Wright State University
 Environmental Monitoring System Institute for Environmental Quality
 Laboratory Dayton, OH 45435
 26 W. Martin Luther Dr.
 Cincinnati, OH 45244

Columbia Environmental Research Great Lakes Environmental Research
 Center Laboratory, NOAA
 U.S. Geological Survey 2205 Commonwealth Boulevard
 4200 New Haven Road Ann Arbor, MI 48105-1593
 Columbia, MO 65201

ПОЗОВАВАНИЯ

- (1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 269-279.
- (2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (5) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (6) Drewes C.D. & Fournier C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. *Develop. Biol.* 138: 94-103.
- (7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chemistry*, Vol. 20, pp. 2000–2007.
- (10) Oetken, M., K.-U. Ludwischowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.
- (11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.

▼ **M6**

Допълнение 6

Обобщение на резултатите от кръговото изпитване

„Изпитване за токсичност на седименти с *Lumbriculus variegatus*“

Таблица 1

Резултати от отделните провеждания на кръговото изпитване: Среден брой червеи в контролите и в контролите на разтворител в края на изпитването; SD = стандартно отклонение; CV = коефициент на вариация.

	среден брой червеи в контролите	SD	CV (%)	n	среден брой червеи в контролите на разтворител	SD	CV (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	39,0	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	36,0	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	38,5	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	30,8	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	26,3	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	30,7	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	28,8	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	27,7	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	21,3	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	35,0	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	33,5	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	15,0	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	43,7	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	21,7	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	31,3	4,79	15,32	4
междулабораторна средна стойност	29,59		20,10		30,61		13,26	
SD	8,32		10,03		7,57		10,48	
n	15				15			
min	16,3				15,0			
max	42,0				43,7			
CV (%)	28,1				24,7			

▼ **M6**

Таблица 2

Резултати от отделните провеждания на кръговото изпитване: Средно общо сухо тегло на червеите на повторение в контролите и в контролите на разтворител в края на изпитването; SD = стандартно отклонение; CV = коефициент на вариация.

	Общо сухо тегло на червеите на повторение (контроли)	SD	CV (%)	n	Общо сухо тегло на червеите на повторение (контроли на разтворител)	SD	CV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
междубораторна средна стойност	25,15		20,36		27,68		17,53	
SD	7,87		12,56		7,41		9,10	
n	15				15			
min	12,9				10,5			
max	41,3				41,4			
CV (%)	31,3				26,8			

▼ M6

Таблица 3

Токсичност на PCP: Обобщение на крайните точки в кръговото изпитване; междублабораторни средни стойности за EC₅₀, NOEC и LOEC; SD = стандартно отклонение; CV = коефициент на вариация.

биологичен параметър		междублабораторна средна стойност (mg/kg)	min	max	междублабораторен фактор	SD	CV (%)	геометр. средна стойност (mg/kg)
общ брой червен	EC ₅₀	23,0	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	9,9	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	27,9	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD (%)	22,5	7,1	39,1				
Общо сухо тегло на червенте	EC ₅₀	20,4	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	9,3	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	25,7	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD (%)	24,8	10,9	44,7				
смъртност/преживяване	LC ₅₀	25,3	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	16,5	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	39,1	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
размножаване (увеличаване на броя на червенте на повторение)	EC ₅₀	20,0	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	7,9	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	22,5	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MDD (%)	29,7	13,9	47,9				
растеж (увеличаване на биомасата на повторение)	EC ₅₀	15,3	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	8,7	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	24,0	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MDD (%)	32,2	13,6	65,2				

MDD: минимална откриваема разлика от контролните стойности по време на тестването на хипотези; използва се като мярка за статистическа мощност

ПОЗОВАВАНЕ

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

▼ M6

В.36. ИЗПИТВАНЕ ЗА РАЗМНОЖАВАНЕ НА ХИЩЕН АКАР
(*HYPOASPIS (GEOLAE LAPS) ACULEIFER*) В ПОЧВАТА

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 226 (2008). Настоящият метод за изпитване е предназначен да се използва за оценка на въздействията от химикали в почвата върху репродуктивната способност на почвени акари от вид *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae), като по този начин се предоставя възможност за оценка на потискането на специфична скорост на растеж на популацията (1,2). Репродуктивната способност тук означава броя на ювенилните индивиди в края на периода на изпитване. *H. aculeifer* представлява допълнително трофично равнище за видовете, за които вече са на разположение методи за изпитване. За целите на настоящия метод за изпитване се счита за достатъчно изпитването за размножаване без разграничаване и количествено определяне на различните етапи от цикъла на размножаване. За химични вещества със сценарий на експозиция, различен от този чрез почвата, биха могли да бъдат по-подходящи други подходи (3).
2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* се приема за относим представител на почвената фауна, и в частност на хищните акари. Той е повсеместно разпространен (5) и може лесно да се събрани и отгледан в лаборатория. Обобщение на биологичните характеристики на *H. aculeifer* се предоставя в допълнение 7. На разположение е обща информация за екологията на вида акари и за използването му в екотоксикологични изпитвания (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

3. Полово зрели женски индивиди се експонират на диапазон от концентрации на изпитвания химикал, примесен с почва. Изпитването се започва с 10 половозрели женски индивиди на съд за повторение. Мъжките индивиди не се въвеждат в изпитването, тъй като опитът показва, че при наличие на мъжки женските копулират незабавно или малко след преминаване на стадия дейтонимфа. Освен това включването на мъжките индивиди може да удължи срока на изпитване с това, че би станало необходимо трудоемкото разграничаване на стадите от жизнения цикъл. По този начин чифтосването само по себе си не е част от изпитването. Женските се въвеждат в изпитването 28—35 дни след началото на периода на снасяне на яйца в синхронизацията (вж. допълнение 4), като тогава женските могат да се смятат вече за копулирани и преминали етапа преди яйцеотлагането. При 20 °C изпитването завършва в ден 14 след въвеждането на женските (ден 0), което позволява на първото контролно поколение да достигне до стадия дейтонимфа (вж. допълнение 4). Като основна измервана променлива се определя броят на ювенилните индивиди на съд за изпитване и, допълнително, броят на преживелите женски. Репродуктивната способност на акарите, експонирани на изпитвания химикал, се сравнява с тази на контролите, за да се определи ЕС_x (например ЕС₁₀, ЕС₅₀ или концентрацията без наблюдавано въздействие (NOEC) (вж. допълнение 1 за определенията), в зависимост от плана на проучването (вж. точка 29). Преглед на графика на изпитването е даден в допълнение 8.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАННИЯ ХИМИКАЛ

4. Предпочита се разтворимостта във вода, log K_{ow}, коефициентът на разпределение почва-вода и парното налягане на изпитвания химикал да са известни. Желателно е да е налична допълнителна информация относно съдбата на изпитвания химикал в почвата, като например скоростите на биотично и абиотично разграждане.
5. Този метод за изпитване може да се използва за разтворими във вода и неразтворими химикали. Начините на прилагане на изпитвания химикал обаче съответно ще се различават. Методът за изпитване е неприложим за летливи химикали, т.е., химикали, за които константата на Хенри или коефициентът на разпределение въздух-вода е по-голям от единица, или за химикали, при които парното налягане превишава 0,0133 Pa при 25 °C.

▼ M6**ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО**

6. Следните критерии трябва да бъдат изпълнени при нетретираните контроли, за да се счита за валиден даден резултат от изпитването:
 - Средна смъртност сред полово зрелите женски индивиди не трябва да надвишава 20 % в края на изпитването;
 - Средният брой на ювенилните индивиди на повторение (при въведени 10 полово зрели женски) следва да бъде най-малко 50 в края на изпитването;
 - Коефициентът на вариация, изчислен за броя на ювенилните акари не трябва да е по-голям от 30 % в края на окончателното изпитване.

РЕФЕРЕНТЕН ХИМИКАЛ

7. Стойностите на ЕС_х и/или NOEC на референтния химикал трябва да бъдат определени, за да се гарантира, че условията на лабораторното изпитване са адекватни, и да се провери дали откликът на изпитваните организми не се е променил с течение на времето. Диметоатът (CAS 60-51-5) е подходящ референтен химикал, за който има показания, че оказва въздействие върху размера на популацията (4). Борната киселина (CAS 10043-35-3) може да се използва като алтернативен референтен химикал. С този химикал е натрупан по-малко опит. При планирането са възможни два варианта:
 - Референтните химикали могат да се изпитват едновременно с определянето на токсичността на всеки изпитван химикал в една концентрация, което е необходимо да се демонстрира предварително в проучване на зависимостта доза-отклик, която да води до въздействие от > 50 % намаление на потомството. В този случай броят на повторенията следва да е същият като този в контролите (вж. точка 29).
 - Като алтернатива, референтният химикал се изпитва 1—2 пъти годишно в изпитване „доза-отклик“. В зависимост от изборния план, броят на концентрациите и повторенията и кратността между концентрациите се различават (вж. точка 29), но като отклик следва да се постигне въздействие от 10—90 % (при кратност 1,8). Стойността на ЕС₅₀ за диметоат въз основа на броя на ювенилните индивиди следва да попада в интервала между 3,0 и 7,0 mg активно вещество/kg почва (сухо тегло). Въз основа на резултатите, получени с борна киселина до момента, ЕС₅₀, получена въз основа на броя на ювенилните индивиди, следва да попада в интервала между 100 и 500 mg/kg почва сухо тегло.

ОПИСАНИЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**Съдове и оборудване за изпитването**

8. Следва да бъдат използвани съдове за изпитване с диаметър 3-5 cm (височина на почвата ≥ 1,5 cm), изработени от стъкло или друг химически инертен материал и разполагащи с плътно прилягащо покритие. Винтовите капачки са за предпочитане, като в този случай съдовете могат да се аерират два пъти седмично. Като алтернатива могат да бъдат използвани, покрития, които позволяват пряк газообмен между субстрата и атмосферата (напр. марля). Тъй като съдържанието на влага трябва да се поддържа достатъчно високо по време на изпитването, от съществено значение е контролът на теглото на всеки съд за изпитване по време на изпитването и добавянето на вода при необходимост. Това може да е от особено голямо значение, ако не са налице винтови капачки. Ако се използва непрозрачен съд за изпитване покритието трябва да е изработено от материал, позволяващ достъп до светлина (напр. чрез перфорирано прозрачно покритие) и в същото време да предотвратява избягването на акарите. Размерът и видът на съда за изпитването зависят от метода за извличане (виж допълнение 5 за повече подробности). Ако се прилага извличане чрез топлина директно към съда за изпитване, тогава може да бъде добавена дънна мрежа с подходящ размер на отвора (запечатана до извличането) и дълбочината на почвата следва да бъде достатъчна, за да се даде възможност за градиент на температурата и влажността.

▼ **M6**

9. Необходимо е стандартно лабораторно оборудване, по-специално следното:

- за предпочитане стъклени съдове с винтови капачки;
- сушилна камера;
- стереомикроскоп;
- четки за прехвърляне на акари
- рН-метър и луксметър;
- подходящи точни везни;
- подходящо оборудване за контрол на температурата;
- подходящо оборудване за контрол на влажността на въздуха (не е от съществено значение, ако съдовете за експозицията са покрити с капаци);
- инкубаторс контролирана температура или малко помещение;
- оборудване за извличане (вж. допълнение 5) (13)
- панел с таванно осветление със светлинен контрол
- буркани за събиране на извлечените акари.

Приготвяне на изкуствената почва

10. За това изпитване се използва изкуствена почва. Изкуствената почва се състои от следните съставки (всички стойности се основават на суха маса):

- 5 % торфен мъх, изсушен на въздух и фино смлян (приема се размер на частиците от 2 ± 1 mm);
- 20 % каолин (за предпочитане съдържанието на каолинит да е над 30 %);
- приблизително 74 % промишлен пясък, изсушен на въздух (в зависимост от количеството на необходимия CaCO_3), предимно фин пясък с над 50 % от частиците между 50 и 200 микрона. Точното количество пясък зависи от количеството на CaCO_3 (вж. по-долу), заедно те следва да доведат до 75 %.
- < 1,0 % калциев карбонат (CaCO_3 на прах, с квалификация „чист“) за получаване на рН, равно на $6,0 \pm 0,5$; количеството на калциевия карбонат за добавяне може да зависи основно от качеството/естеството на торфа (вж. Забележка 1).

Забележка 1: Изискваното количество CaCO_3 ще зависи от съставките на почвения субстрат и следва да бъде определено чрез измерване на рН на почвени подпроби непосредствено преди изпитването (14).

Забележка 2: съдържанието на торф 1 изкуствената почва се отклонява от други методи за изпитване върху живеещите в почвата организми, при които в повечето случаи се използва 10 % торф (напр. (15)). Независимо от това, според ЕРРО (16) типичната земеделска почва съдържа не повече от 5 % органична материя, като по този начин намаляването на съдържанието на торф отразява намалените възможности на естествената почва за сорбция на изпитвания химикал от органичен въглерод.

Забележка 3: Ако се изисква, например за конкретни цели на изпитвания, естествените почви от незамърсени източници също могат да бъдат използвани като субстрат за изпитванията и/или за отглеждане. Независимо от това, ако се използва естествена почва, тя следва да бъде характеризирана най-малко по отношение на произхода (място, от което е взета), рН, текстура (зърнометричен състав) и съдържание на органична материя. Ако са налични, следва да бъдат включени типът и наименованието на почвата съгласно почвена класификация, и почвата трябва да не съдържа никакви замърсявания. В случай че

▼ **M6**

изпитваният химикал е метал или органометално съединение, също трябва да се определи и катионообменният капацитет на естествената почва. Специално внимание следва да се обърне на съответствието на критериите за валидност, тъй като общата информация за естествените почви обикновено се среща рядко.

11. Сухите съставки на почвата се смесват старателно (напр. в голямо лабораторно устройство за смесване). За определянето на рН се използва смес от почва и разтвор на 1 М калиев хлорид (KCl) или 0,01 М калциев хлорид (CaCl₂) в съотношение 1:5 (вж. (14) и Допълнение 3). Ако почвата е по-киселинна от изисквания диапазон (вж. точка 10), може да бъде коригирана чрез добавяне на подходящо количество CaCO₃. Ако почвата е твърде алкална, може да се коригира чрез добавяне на повече от сместа, състояща се от първите три съставки, описани в точка 10, но без съдържание на CaCO₃.
12. Максималната способност за задържане на вода (СЗВ) на изкуствената почва се определя в съответствие с процедурите, описани в допълнение 2. От два до седем дни преди началото на изпитването сухата изкуствена почва предварително се навлажнява чрез добавяне на достатъчно количество дестилирана или дейонизирана вода, до получаване на приблизително половината от крайното съдържание на вода, което представлява 40 до 60 % от максималната СЗВ. Влажността се коригира до 40-60 % от максималната СЗВ чрез добавяне на разтвор на изпитвания химикал и/или като се добавя дестилирана или дейонизирана вода (вж. точки 16—18). Следва да се извърши допълнителна приблизителна проверка на съдържанието на влага в почвата чрез леко стискане в ръка на почвата — ако съдържанието на влага е коректно, трябва между пръстите да се появят малки капки вода.
13. Съдържание на влага в почвата се определя в началото и в края на изпитването чрез изсушаване до постоянно тегло при 105 °C в съответствие с ISO 11465 (17), а рН на почвата — в съответствие с допълнение 3 или ISO 10390 (14). Тези измервания трябва да бъдат извършвани в допълнителни проби без акари, както от контролната почва, така и от почва с всяка една изпитвана концентрация. Когато се изпитват химикали с кисела или основна реакция, стойността на рН на почвата не трябва да се коригира. Съдържанието на влага трябва да се следи по време на изпитването посредством периодично претегляне на съдовете (вж. точки 20 и 24).

Избор и приготвяне на изпитваните животински видове

14. Използваният в изпитването вид е *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). За започване на изпитването се изискват полово зрели женски акари, получени от синхронизирана кохорта. Акарите следва да бъдат въведени около 7—14 дни след като са станали полово зрели, 28—35 дни след началото на периода на снасяне на яйца в синхронизацията (вж. точка 3 и допълнение 4). Източникът или доставчикът на акари, и поддръжката на лабораторната култура следва да бъдат записани. Ако дадена лабораторна култура се съхранява, препоръчително е идентичността на видовете да се потвърждава най-малко веднъж годишно. Идентификационен формуляр е включен в допълнение 6.

Приготвяне на концентрации за изпитване

15. Изпитваният химикал се смесва с почвата. Органичните разтворители, използвани за третиране на почвата с изпитвания химикал, следва да се подбират въз основа на тяхната ниска токсичност за акари, като в плана за изпитването трябва да бъде включена и подходяща контрола на разтворител (вж. точка 29).

Разтворим във вода изпитван химикал

16. Разтвор на изпитвания химикал се приготвя в дейонизирана вода в количество, достатъчно за всички повторения на една концентрация за изпитване. Препоръчително е да се използва подходящо количество вода до достигане на изискуемото съдържание на влага, т.е. 40—60 % от максималната СЗВ (вж. точка 12). Всеки разтвор на изпитвания химикал се смесва старателно с една партида от предварително навлажнена почва преди да бъде внесен в съда за изпитване.

▼ **M6***Неразтворим във вода изпитван химикал*

17. За химикалите, които са неразтворими във вода, но разтворими в органични разтворители, изпитваният химикал може да бъде разтворен във възможно най-малък обем подходящ носител (напр. ацетон). Следва да се използват само летливи разтворители. Когато се използват такива носители, всички изпитвани концентрации и контролата трябва да съдържат еднакво минимално количество от носител. Носителят се разпръсква върху (или се смесва с) малко количество фин кварцов пясък, например 10 g. Общото съдържание на пясък в субстрата трябва да се коригира за това количество. Носителят се отстранява чрез изпаряване в лабораторна камина в продължение най-малко на един час. Сместа от кварцов пясък и изпитван химикал се добавя в предварително навлажнената почва и старателно се смесва, чрез добавяне на подходящо количество дейонизирана вода, за да се получи необходимото съдържание на влага. Крайната смес се въвежда в съдовете за изпитване. Следва да се отбележи, че някои разтворители могат да бъдат токсични за акари. Следователно се препоръчва използване допълнителна контрола на вода без носител, ако токсичността на разтворителя за акари не е известна. Ако е доказано в достатъчна степен, че разтворителят (в концентрациите, които ще се прилагат) не оказва въздействие, контролата на вода може да бъде изключена.

Изпитван химикал, малко разтворим във вода и органични разтворители

18. За малко разтворимите във вода и в органични разтворители химикали, еквивалентът на 2,5 g фино стрит кварцов пясък на изпитвателен съд (например 10 g фин кварцов пясък за четири повторения) се смесва с количеството изпитван химикал, така че да се получи желаната концентрация за изпитването. Общото съдържание на пясък в субстрата трябва да се коригира за това количество. Сместа от кварцов пясък и изпитван химикал се добавя в предварително навлажнената почва и старателно се смесва, след добавяне на подходящо количество дейонизирана вода, за да се получи необходимото съдържание на влага. Крайната смес се разпределя между съдовете за изпитване. Процедурата се повтаря за всяка концентрация за изпитване, като се приготвя и подходяща контрола.

ПРОЦЕДУРА**Групи на изпитване и контроли**

19. Препоръчват се десет полово зрели женски индивида в 20 g суха маса изкуствена почва, за всеки отделен съд с контролни проби и с третирани проби. Изпитваните организми трябва да бъдат добавени в рамките на два часа след приготвянето на крайния субстрат за изпитването (т.е., след прилагането на изпитвания обект). В някои специфични случаи (напр. когато фазата от жизнения цикъл се счита за определящ фактор), времето между приготвянето на крайния субстрат за изпитването и добавянето на акарите може да бъде удължено (за подробна информация, свързана с тази фаза от жизнения цикъл, вж. (18). Независимо от това, в такива случаи трябва да се представи научна обосновка.
20. След добавянето на акарите в почвата, на същите се предоставя храна, като следва да се измери първоначалното тегло на всеки съд за изпитване, за да се използва като референтна информация за наблюдение на съдържанието на влага в почвата през цялото време на изпитването, както е описано в точка 24. След това изпитваните съдове се покриват, както е описано в точка 8, и се поставят в изпитвателната камера.
21. Изготвят се подходящи контроли за всеки от методите за прилагане на изпитвания химикал, описани в точки от 15 до 18. За приготвяне на контролите се следват описаните относими процедури, с изключение на това, че не се добавя изпитваният химикал. Следователно, при необходимост към контролите се прилагат органични разтворители, кварцов пясък или други носители, в концентрации/количества като тези при третиранията. Когато за добавяне на изпитвания химикал се използва разтворител или друг носител, следва да се подготви и изпита допълнителна контрола без носителя или изпитвания химикал, в случай че токсичността на разтворителя не е известна (вж. точка 17).

▼ **M6****Условия на изпитването**

22. Температурата на изпитването трябва да бъде 20 ± 2 °C. Температурата трябва да се записва най-малко веднъж дневно и да се регулира, ако е необходимо. Изпитването се провежда при контролирани цикли светлина-тъмнина (за предпочитане 16 часа светлина и 8 часа тъмнина) с осветление от 400 до 800 lux в зоната на съдовете за изпитване. По съображения за сравнимост, тези условия са същите, както и при други екотоксикологични изпитвания на почвата (напр. (15)).
23. Газообменът следва да бъде гарантиран чрез аериране на съдовете за изпитване поне два пъти седмично, в случай че се използват винтови капачки. Ако се използват покрития от марля, специално внимание следва да се отдели на поддържането на съдържанието на влага в почвата (вж. точки 8 и 24).
24. Съдържанието на вода в почвения субстрат в изпитваните съдове се поддържа по време на цялото изпитване чрез претегляне на съдовете за изпитване и, при необходимост, добавяне на вода в тях (например веднъж седмично). При необходимост загубите се попълват с дейонизирана вода. Съдържанието на влага по време на изпитването не трябва да се отклонява с повече от 10 % от началната стойност.

Хранене

25. Доказано е, че акарите от вида *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781) са подходящ източник на храна. Малки колемболи (напр. ювенилни *Folsomia candida* Willem, 1902 или *Onychiurus fimatus* (19), (20), представители на семейство Enchytraeidae (напр. *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) или нематоди (напр. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913)) могат да бъдат също подходящи (21). Препоръчва се проверка на храните преди използването им в изпитване. Видът и количеството на храната следва да осигуряват достатъчен брой ювенилни екземпляри, за да бъдат изпълнени критериите за валидност (точка 6). По отношение на жертвите следва следва да се вземе предвид начинът на действие на изпитвания обект (напр. акарицид може да бъде токсичен и за акарите в храните, вж. точка 26).
26. Храната трябва да се предоставя *ad libitum* (т.е. малки количества всеки път (на върха на шпатулата)). За тази цел могат също да се използват и смукателен вентилатор със слаба тяга, както е предложено в изпитването с колемболи, или фина бояджийска четка. Даването на храна в началото на изпитването и два до три пъти в седмицата обикновено е достатъчно. Когато изглежда, че изпитваният обект е токсичен за жертвите, следва да бъде взета предвид увеличена скорост на храненето и/или алтернативен източник на храна.

Избор на концентрации на изпитване

27. Предварителното познаване на токсичността на изпитвания химикал следва да помогне при избора на подходящи концентрации на изпитване, например от проучвания за определяне на обхвата. Когато е необходимо, се извършва изпитване за определяне на обхвата с пет концентрации на изпитвания химикал в диапазон от 0,1—1 000 mg/kg суха почва, с поне едно повторение за третираните проби и контролите. Продължителността на изпитването за определяне на обхвата е 14 дни, след което се определят смъртността на половозрелите акари и броят на ювенилните екземпляри. Диапазонът на концентрациите при окончателното изпитване трябва за предпочитане да бъде избран така, че да включва концентрации, при които има въздействие върху броя ювенилни индивиди, но няма въздействие върху преживяването на родителското поколение. Това обаче може да не е възможно при химикали, които причиняват летално и сублетално въздействие в почти сходни концентрации. Концентрацията, при която се проявява въздействие (напр. EC₅₀, EC₂₅, EC₁₀), и диапазонът от концентрации, над който въздействието на изпитвания химикал е от значение, следва да бъдат обхванати от концентрациите, включени в изпитването. Екстраполации за стойности, много по-ниски от най-ниската концентрация на въздействие върху изпитваните организми, или по-високи от най-високата концентрация на изпитване, следва да се правят само в изключителни случаи, като в протокола следва да се даде пълно обяснение.

План на проучването*Изпитвания доза-отклик*

28. Въз основа на препоръките от друго кръгово изпитване (изпитване на метод за размножаване на представители на сем. Enchytraeidae) се

▼ **M6**

предлагат три вида планове за изпитване (22). Общата пригодност на всички тези планове е била потвърдена с резултатите от валидирането за *H. aculeifer*.

29. При определяне границите на концентрация се взема предвид следното:
- За определяне на EC_x (напр. EC_{10} , EC_{50}) следва да се изпитат дванадесет концентрации. Препоръчват се най-малко две повторения за всяка концентрация на изпитване и шест контролни повторения. Кратността на разделянето може да варира, т.е., да е по-малка или равна на 1,8 в диапазона на очакваното въздействие и над 1,8 при по-високите и по-ниските концентрации.
 - За определяне на NOEC следва да се изпитат най-малко пет концентрации в геометрична прогресия. Препоръчват се четири повторения за всяка концентрация за изпитване, плюс осем контроли. Концентрациите трябва да бъдат разделени една от друга с кратност, която не превишава 2,0.
 - Комбинираният подход дава възможност за едновременно определяне на NOEC и EC_x . Следва да бъдат използвани осем концентрации на третиране в геометрична прогресия. Препоръчват се четири повторения за всяко третиране, плюс осем контроли. Концентрациите трябва да бъдат разделени една от друга с кратност, която не превишава 1,8.

Гранично изпитване

30. Ако при изпитването за определяне на обхвата не се наблюдават въздействия при най-високата концентрация (т.е. 1 000 mg/kg сухо тегло на почвата), окончателното изпитване за размножаването може да бъде проведено като гранично изпитване, като се използва концентрация на изпитване от 1 000 mg/kg сухо тегло на почвата. Граничното изпитване ще предостави възможност да се демонстрира, че стойността на NOEC или EC_{10} за размножаването е по-висока от пределната концентрация, едновременно с намаляване до минимум на броя акари, използвани в изпитването. По осем повторения следва да се използват както за третираната почва, така и за контролата.

Продължителност на изпитването и измервания

31. Всички установени разлики между поведението и морфологията на акарите в контролите и третираните съдове следва да бъдат записани.
32. На ден 14 преживелите акари се извличат от почвата чрез топлина/светлина, или чрез друг подходящ метод (вж. допълнение 5). Броенето на ювенилните (т.е. ларва, протонимфа, дейтонимфа) и полово зрелите екземпляри се извършва отделно. Всички полово зрели акари, които не са намерени по това време, трябва да бъдат записани като мъртви, като се допуска, че такива акари са умрели и са се разградили преди оценката. Ефикасността на извличането трябва да бъде валидирана веднъж или два пъти в годината в контроли с известен полово зрели и ювенилни екземпляри. Ефикасността следва да бъде над 90 % средно, комбинирана за всички стадии на развитие (вж. допълнение 5). Преброяване на полово зрелите и ювенилните екземпляри не се коригира с оглед на ефикасността.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Обработка на резултатите**

33. Информация относно статистическите методи, които могат да бъдат използвани за анализ на резултатите от изпитването, е представена в точки 36—41. В допълнение следва да бъде консултиран Документ № 54 на ОИСР относно „Съвременни подходи за статистически анализ на данни за екотоксичност: насоки за прилагане“ (31).
34. Основната крайна точка на изпитването е репродуктивната способност, в случая броят на ювенилните индивиди, получени на съд за изпитване с повторение (с въведени 10 полово зрели женски). За статистическия

▼ **M6**

анализ се изисква средно аритметичната стойност (\bar{X}) и дисперсията (s^2) за репродуктивната способност да бъдат изчислени на третирана проба и на контрола. \bar{X} и s^2 се използват за процедурите на ANOVA, като t-тест на Стюдънт, тест на Дънет или тест на Уйлямс, както и за изчисляването на 95 %-ните доверителни интервали.

Забележка: Тази основна крайна точка е равностойна на плодовитост, измерена чрез броя на живите ювенилни екземпляри, получени по време на изпитването, разделен на броя на родителските женски, въведени в началото на изпитването.

35. Броят на преживелите женски индивиди в нетретираните контроли е основен критерий за валидност и трябва да бъде документиран. Също както и при изпитването за определяне на обхвата, всички други признаци за неблагоприятно въздействие трябва да бъдат записани и в окончателния протокол.

ЕС_x

36. Стойностите на ЕС_x, включително свързаните с тях долни и горни 95 %-ни доверителни граници за описания в точка 34 параметър, се изчисляват с помощта на подходящи статистически методи (например пробит-анализ, логистична функция или функция на Вейбул, метод на Спирмън-Карбър с изключване на данни, или обикновена интерполация). Стойност на ЕС_x се получава чрез добавяне на стойност, съответстваща на x % от средната стойност на контролна проба в уравнението. За изчисляване на ЕС₅₀ или всяка друга стойност ЕС_x, средните стойности от всяко третиране (\bar{X}) следва да бъдат подложени на регресионен анализ.

НОЕС/ЛОЕС

37. Ако със статистическия анализ се цели определяне на НОЕС/ЛОЕС, необходими са статистики за всеки отделен съд (индивидуалните съдове се разглеждат като повторения). Трябва да се използват подходящи статистически методи (съгласно документ на ОИСП № 54 „Съвременни подходи за статистически анализ на данни за екоотоксичност: насоки за прилагане“ (Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application). По принцип неблагоприятните въздействия на изпитвания обект в сравнение с контролата се проучват чрез проверяване на (по-малката) едностранна хипотеза при $p \leq 0,05$. Примери са дадени в следващите точки.
38. Нормалността на разпределението на данните може да се тества например с тест на Колмогоров-Смирнов за качество на апроксимацията, тест с тестова статистика отношението на размаха към стандартното отклонение (R/s-тест) или тест на Шапиро-Уилк (двустранен, $p \leq 0,05$). За тестване на хомогенността на дисперсията могат да се използват тест на Кокрън, тест на Левин или тест на Бартлет, (двустранен, $p \leq 0,05$). Ако са изпълнени критериите за използване на параметрични тестови процедури (нормалност, хомогенност на дисперсията), могат да се извършат еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA) и последващи множествени сравнения. Множествени сравнения (например t-тест на Дънет) или трендови тестове със стъпка назад (напр. тест на Уйлямс при монотонна зависимост доза-отклик) могат да се използват за изчисляване дали са налице статистически значими разлики ($p \leq 0,05$) между контролите и различните концентрации на изпитвания обект (избор на препоръчителния тест в съответствие с документ № 54 на ОИСП „Съвременни подходи за статистически анализ на данни за екоотоксичност: насоки за прилагане“ (Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application). В противен случай за определяне на НОЕС и ЛОЕС следва да се използват непараметрични методи (напр. U-тест на Бонферони по Holm или трендов тест на Йонкхере-Терпстра).

Гранично изпитване

39. Ако е извършено гранично изпитване (сравнение на контрола и само на едно третиране) и са изпълнени критериите за използване на параметрични тестови процедури (нормалност, хомогенност), метричните отклици могат да бъдат оценени чрез тест на Стюдънт (t-тест). Ако тези критерии не са изпълнени, може да се използва t-тест за нееднаква дисперсия (t-тест на Уелч) или непараметричен тест, напр. U-тест на Ман-Уитни.
40. За установяване на значими разлики между контролите (контрола и контрола на разтворител), повторенията на всяка контрола могат да се изпитват както е описано при граничното изпитване. Ако при тези

▼ **M6**

изпитвания не бъдат установени значими разлики, всички повторения на контроли и контроли на разтворител могат да бъдат обединени. В противен случай всички третираня следва да бъдат сравнявани с контролата на разтворител.

Протокол от изпитването

41. Протоколът от изпитването следва да включва най-малко следната информация:

— *Изпитван химикал*

- идентичността на изпитвания химикал, наименование, партида, пратка и номер по CAS, чистота;
- физични и химични свойства на изпитвания химикал (напр. $\log K_{ow}$, разтворимост във вода, парно налягане, константа на Хенри (H) и, за предпочитане, информация относно съдбата на изпитвания химикал в почвата);

— *Изпитвани организми*

- Идентификация и доставчик на изпитваните организми, описание на условията за отглеждане;
- възрастов диапазон на изпитваните организми.

— *Условия на изпитването*

- описание на плана на проучването и на процедурата;
- подробни данни за приготвянето на почвата за изпитване; подробна спецификация, ако се използва естествена почва (про-изход, история, зърнометричен състав, рН, съдържание на органична материя, и класификация на почвата, ако има налична)
- максималната способност на почвата за задържане на вода;
- описание на техниката, използвана за прилагане на изпитвания химикал към почвата;
- подробни данни за спомагателните химикали, използвани за прилагането на изпитвания химикал;
- размер на съдовете за изпитване и суха маса на почвата за изпитването на съд за изпитване;
- условия на изпитване: интензитет на светлината, продължителност на циклите светлина-тъмнина, температура;
- описание на режима на хранене, вида и количество на храната, използвана при изпитването, дати на хранене;
- стойност на рН и съдържание на вода в почвата в началото и по време на изпитването (контрола и всяко третиране)
- подробно описание на метода на извличане и на ефикасността на извличането.

— *Резултати от изпитванията*

- броят на ювенилните екземпляри, определени във всеки от съдовете за изпитване в края на изпитването;
- броят на полово зрелите женски екземпляри и смъртността при полово зрелите екземпляри (%), във всеки от съдовете за изпитване в края на изпитването
- описание на видими симптоми, или явни промени в поведението;
- резултатите, получени с референтния изпитван химикал;
- обобщени статистики (ЕСх и/или NOEC) включително 95 %-ни доверителни граници и описание на метода на изчисление;

▼ M6

— графично изобразяване на зависимостта концентрация-отклик;

— отклонения от процедурите, описани в настоящия метод за изпитване, и всички необичайни обстоятелства по време на изпитването.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). *Gayana Zool.* 57, 21-46.
- (2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. *Pacific Insects* 24, 259-274.
- (3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. *JSS — Journal of Soils and Sediments* 3, 73-77.
- (4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition In: Dahl, F. (Hrsg.): *Die Tierwelt Deutschlands* 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.
- (5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the population development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): *Modern Acarology*. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492
- (6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). *Proc. 2nd Symp. EURAAC*: p 241-249.
- (7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. *Proc. IXth Internat. Congr. Acarol.* 1994, Columbus, Ohio: p 621-628.
- (8) Krogh, P.H. and Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: *Handbook of soil invertebrate toxicity tests*. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.
- (9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Rømbke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests — Invertebrates. In: *Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils*. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.
- (10) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. *Zool. Beiträge*, 34, 395-433.
- (11) Schlosser, H.-J. 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.* N.F. 34, 413-433.
- (12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Gamasida: Laelapidae). *Environmental Science & Technology* 39, 7154-7157.
- (13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. *Natura Jutlandica* 20, 95-122.
- (14) ISO (International Organization for Standardization) (1994). *Soil Quality — Determination of pH*, No. 10390. ISO, Geneva.

▼ **M6**

- (15) Глава В.8 от настоящото приложение — „Токсичност за земни червеи“.
- (16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.
- (17) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneva.
- (18) Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.
- (19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit *Onychiurus fimatus* Gisin (Collenbola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.
- (20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.
- (21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.
- (22) Глава В.32 от настоящото приложение- Изпитване за размножаване на представители на сем. Enchytraeidae.
- (23) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneva.
- (24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.
- (25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.
- (26) Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with „good genes“ in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.
- (27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.
- (28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.
- (29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasidae). Zoologica Poloniae 24, 11-59.
- (30) Kevan, D.K. McE. and Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). Acarologia 6, 647-658.
- (31) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18

▼ M6*Допълнение 1***Определения**

В настоящия метод за изпитване са приложими следните определения (в настоящото изпитване всички ефективни концентрации се изразяват като масата на изпитвания химикал към сухата маса на почвата за изпитване):

Химикал означава вещество или смес.

NOEC (концентрация без наблюдавано въздействие) е концентрацията на изпитвания химикал, при която не се наблюдава въздействие. В настоящото изпитване концентрацията, съответстваща на NOEC, няма статистически значимо ($p < 0,05$) въздействие в рамките на даден период на експозиция, при сравнение с контролата.

LOEC (най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект) е най-ниската концентрация на изпитвания химикал, при която е наблюдавано статистически значимо въздействие ($p < 0,05$) в рамките на даден период на експозиция, при сравнение с контролата.

EC_x (ефективна концентрация, при която се наблюдава x % от въздействието) е концентрацията, която причинява x % от дадено въздействие на изпитвани организми в рамките на даден период на експозиция, при сравнение с контрола. Например EC₅₀ е концентрация, за която е направена оценка, че предизвиква дадено въздействие върху изпитвана крайна точка в 50 % от експонираната популация в рамките на определен период на експозиция.

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

▼ **M6**

Допълнение 2

Определяне на максималната способност на почвата за задържане на вода

Следният метод за определяне на максималната способност на почвата за задържане на вода се счита за подходящ. Той е описан в приложение В към ISO DIS 11268-2 (Качество на почвите — въздействия на замърсители върху земни червеи (*Eisenia fetida*). Част 2: Определяне на въздействията върху размножаването (23)).

Взема се определено количество (например 5 г) изпитван почвен субстрат с помощта на подходящо устройство за пробовземане (шнекова сонда и т.н.). Дъното на сондата се покрива с парче филтърна хартия, напоено с вода, и след това се поставя на стойка на водна баня. Сондата следва постепенно да се потапя във водата, докато водното ниво стане над повърхността на почвата. След това тя се оставя във водата за около три часа. Тъй като не цялото количество вода, абсорбирано от почвените капилари, може да бъде задържано, почвената проба следва да се остави да се отцеди в продължение на два часа чрез поставяне на сондата върху легло от много влажен фино смлян кварцов пясък, намиращо се в покрит съд (за да се предотврати изсушаването). След това тази проба трябва да бъде претеглена и изсушена до постоянна маса при 105 °С. Способността за задържане на вода (СЗВ) може да се изчисли, както следва:

$$\text{СЗВ(в \% от сухата маса)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

където:

S = водонаситен субстрат + маса на сондата + маса на филтърната хартия

T = тара (маса на сондата + маса на филтърната хартия)

D = сухата маса на субстрата

▼ M6*Допълнение 3***Определяне на стойността на рН на почвата**

Описаният по-долу метод за определяне на рН на почвата се основава на описанието в ISO DIS 10390: Качество на почвите — Определяне на рН (16).

Определено количество почва се изсушава при стайна температура в продължение на най-малко 12 часа. След това се приготвя суспензия от почвата, (съдържаща най-малко 5 грама почва) в нейния петкратен обем или в 1 М разтвор на калиев хлорид (KCl) с квалификация „чист“, или в 0,01 М разтвор на калциев хлорид (CaCl₂) с квалификация „чист“. След това суспензията се разклаща добре в продължение на пет минути и се оставя да се утаи в продължение на най-малко 2 часа, но не повече от 24 часа. След това се измерва стойността на рН на течната фаза с помощта на рН-метър, който е бил калибриран преди всяко измерване чрез подходящ набор от буферни разтвори (напр. рН 4,0 и 7,0).

▼ M6

Допълнение 4

Отглеждане на *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, акари в храните и синхронизиране на културата**Отглеждане на *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*:**

Културите могат да бъдат поддържани в пластмасови съдове или стъклени буркани, напълнени със смес от парижки гипс/въглен на прах (9:1). Гипсът може да се поддържа влажен чрез добавяне на няколко капки дестилирана или дейонизирана вода, ако е необходимо. Оптималната температура на отглеждането е 20 ± 2 °C, режимът светлина/тъмнина не е от значение за този вид. Жертвите могат да бъдат акари от видовете *Tyrophagus putrescentiae* или *Caloglyphus* sp. (акарите в храните трябва да бъдат третирани внимателно, тъй като те биха могли да предизвикат алергии при хората), но нематодите, представителите на семейство Enchytraeidae и колемболите също са подходящи като обекти, представляващи жертва. Техният източник следва да бъде записан. Развитието на популацията може да започне с една женска, тъй като мъжките се развиват в неоплодени яйца. Поколенията до голяма степен се припокриват. Женският индивид може да живее най-малко 100 дни, като през този период може да снесе приблизително 100 яйца. Максималната скорост на снасяне на яйца се достига между 10 и 40 дни (след достигането на полова зрялост) и възлиза на 2,2 яйца женска⁻¹ ден⁻¹. Времето за развитие от яйцето до полово зрелия женски индивид е около 20 дни при 20 °C. Предварително следва да се отглежда и съхранява повече от една култура.

Отглеждане на *Tyrophagus putrescentiae*:

Акарите се съхраняват в стъклен съд, запълнен с бирена мая на фин прах, която е поставена в пластмасов контейнер, напълнен с разтвор на KNO₃ с цел да се предотврати избягване. Акарите в храните се поставят в горната част на този прах. След това те внимателно се разбъркват с праха (който трябва да се сменя два пъти седмично) с помощта на шпатула.

Синхронизиране на културата:

Екземплярите, използвани при изпитването, трябва да бъдат на сходна възраст (около 7 дни след достигане на полова зрялост). При отглеждане на температура от 20 °C това се постига чрез

прехвърляне на женските в чист съд за отглеждане и добавяне на достатъчно количество храна

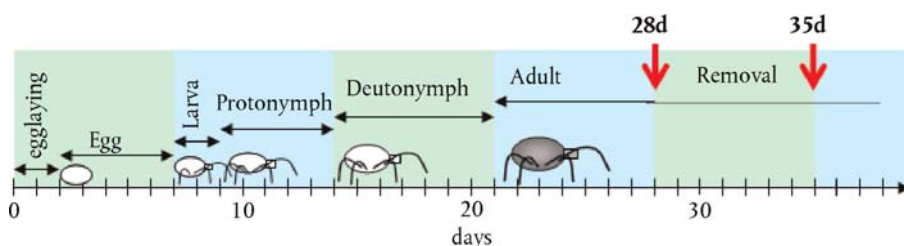
— даване на възможност за снасяне на яйца от два до три дни, отстраняване на женските

— вземане на полово зрелите женски индивиди между 28-ия и 35-ия ден след поставянето на женските в чисти съдове за отглеждане.

Полово зрелите женски индивиди могат лесно да бъдат различени от мъжките и от индивидите на други етапи от развитие по по-големите си размери, подутата си форма и кафявия дорзален щит (мъжките са по-тънки и плоски), индивидите, които не са достигнали полова зрялост, са с бял до кремав цвят. Развитието на акари следва приблизително модела, описан по-долу при 20 °C (фигура): яйце 5 дни, ларва 2 дни, протонимфа 5 дни, дейтонимфа 7 дни, етап преди яйцеотлагането при женските 2 дни. След това акарите са полово зрели.

Фигура:

Развитие на *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* при 20 °C. (отстраняване = женски индивиди, използвани за изпитването)



▼ M6

Полово зрелите изпитвани екземпляри се отстраняват от синхронизираната култура и се въвеждат в съдовете за изпитване между 28-ия и 35-ия ден след като родителските женски индивиди са започнали снасянето на яйца (т.е., 7—14 дни след като са достигнали полова зрялост). По този начин се гарантира, че изпитваните екземпляри вече са преминали етапа преди яйцеотлагането и са копулирали с мъжки, които също се намират в съда за отглеждане. Наблюденията върху култури в лабораторни условия показват, че при наличие на мъжки женските копулират незабавно или малко след достигане на полова зрялост (Ruf, Vaninnen, лич. набл). Периодът от седем дни е избран така, че да се улесни интегрирането към условията на лабораторната работа и да се ограничи варирането в индивидуалното развитие сред акарите. Снасянето на яйца следва да започне най-малко със същия брой женски индивиди, който евентуално е необходим за изпитването (например ако в изпитването са необходими 400 женски, поне на 400 женски следва да се даде възможност за снасяне на яйца от два до три дни. Минимум 1 200 яйца следва да бъдат началната точка за синхронизираната популация (съотношение между половете около 0,5, смъртност около 0,2). За да се избегне канибализмът е по-практично в един съд да се държат не повече от 20-30 снасящи яйца женски.

▼ M6

Допълнение 5

Методи за извличане

Извличането чрез топлина е подходящ за микроартроподи метод за отделяне на индивидите от почвата/субстрата (вж. фигурата по-долу). Методът се основава на активността на организмите, следователно ще могат да бъдат регистрирани само мобилни екземпляри. Принципом на извличането чрез топлина е постепенното влошаване на условията за организмите в пробата по такъв начин, че те да напуснат субстрата и да попадат в течност за фиксиране (напр. етанол). Ключови точки са продължителността на извличането и градиентът от добри през умерени до лоши условия за организмите. Продължителността на извличането за екотоксикологични изпитвания трябва да бъде възможно най-малка, защото всяко нарастване на популацията по време на извличането би довело до неверни резултати. От друга страна температурата и влажността като условията в пробата трябва да бъдат винаги в обхват, който позволява на акарите да се движат. Затоплянето на почвената проба води до изсушаване на субстрата. В случай че изсушаването е твърде бързо, някои акари биха могли също да бъдат изсушени преди да успеят да напуснат.

Следователно се предлага следната процедура (24) (25):

Апаратура: Фуния на Тулгрен или сравними методи, като например на Макфадиев (затопляне отгоре, пробата се поставя върху фуния)

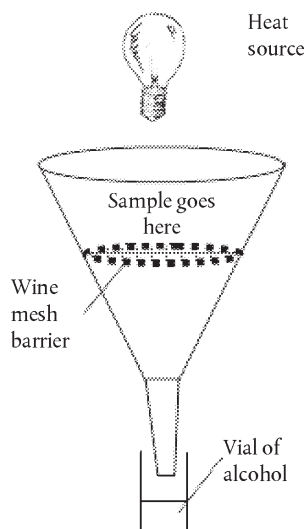
Режим на затоплянето: 25 °C в продължение на 12 часа, 35 °C в продължение на 12 часа, 45 °C в продължение на 24 часа (общо 48 часа). Температурата трябва да се измерва в субстрата.

Течност за фиксиране: 70 % етанол

Подробни данни: Взема се стъклен флакон, който е използван за изпитването. Отстранява се капачката и около отвора се увива парче от мрежа или тъкан. Тъканта трябва да е с размер на отвора от 1,0 до 1,5 mm. Тъканта се фиксира с еластична лента. Флаконът се обръща внимателно с дъното нагоре и се поставя в апаратурата за извличане. Тъканта предотвратява процеждането на субстрат в течността за фиксиране, но дава възможност на акарите да напуснат пробата. Режимът на затопляне започва след поставянето на всички флакони. Извличането се прекратява след 48 часа. Флаконите за фиксиране се отстраняват и акарите се преброяват чрез стереомикроскоп.

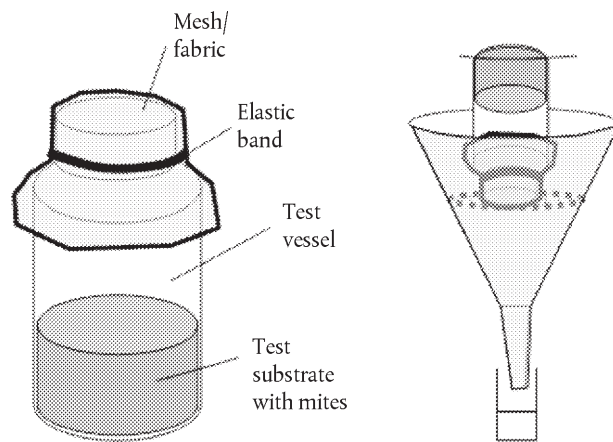
Ефикасността на извличането на избрания метод трябва да се доказва веднъж или два пъти годишно, като се използват съдове, които съдържат предварително известен брой ювенилни и полово зрели акари, държани в нетретиран субстрат за изпитване. Ефикасността следва да бъде $\geq 90\%$ средно, комбинирана за всички стадии на развитие.

Устройство за извличане от тип Тулгрен



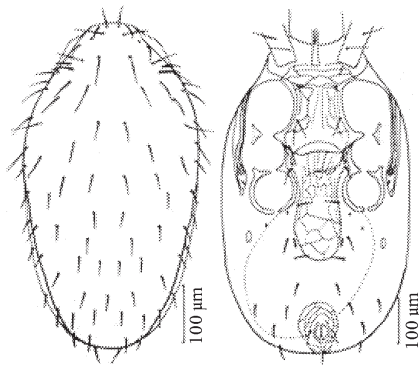
▼ M6

Как да се приготви флаконът за изпитване след приключване на изпитването, преди извличането

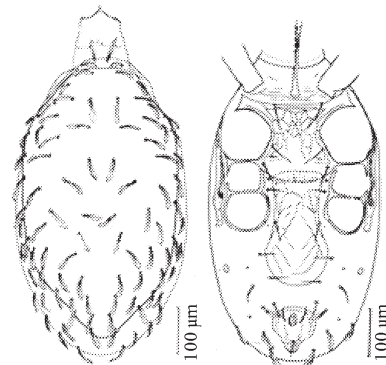


Идентификация на *Hyoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

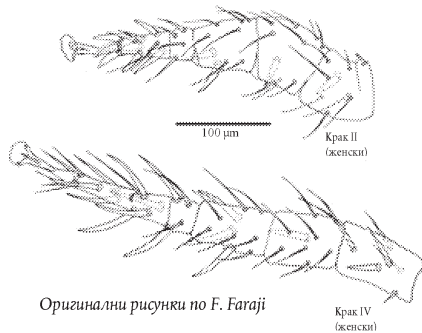
Подклас/разред/подразред:	Семейство:	Род/подрод/вид:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	<i>Hyoaspis (Geolaelaps) aculeifer</i>
Автор и дата:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 January 2007	
Използвана литература:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1-523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400pp. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.	
Характеристики за определяне:	<p>тектумът със закръглен назъбен край; хипостомалните бразди с повече от 6 зъбци; опашните дорзални четинки от Z4 не много дълги; дорзалните четинки четинковидни; гениталният щит нормален, не много разширен и не достигащ до аналния щит; Задната половина от дорзалния щит без нечифтни четинки; крака II и IV с няколко дебели големи четинки; дорзална четинка Z5 около два пъти по-дълга от J5; неподвижният палец на хелицерата с 12-14 зъбци, а подвижният палец с 2 зъбци; Дължина на идиосомата 520-685 микрона.</p> <p><i>Hyoaspis miles</i> също се използва за биологичен контрол и може да се обърка с <i>H. aculeifer</i>. Основната разлика е: <i>H. miles</i> принадлежи към подрод <i>Cosmolaelaps</i> и е с подобни на нож дорзални четинки, докато <i>H. aculeifer</i> принадлежи към подрод <i>Geolaelaps</i> и е с четинковидни дорзални четинки.</p>	



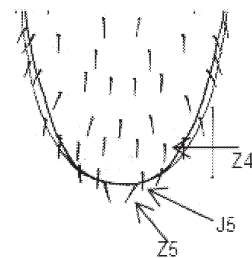
Hyoaspis aculeifer по Hughes, 1976



Hyoaspis miles по Hughes, 1976



Оригинални рисунки по F. Faraji

Крак IV
(женски)Hyoaspis aculeifer,
дорзален щит с характерни четинки

▼ M6

Допълнение 7

Основна информация за биологичните характеристики на *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Hypoaspis aculeifer принадлежи към семейство Lealapidae, разред Acari (акари), клас Arachnida, тип Arthropoda. Живеят във всички видове почви и се хранят с други акари, нематоди, енхитреиди и колемболи (26). В случай на недостиг на храна преминават към канибализъм (27). Тялото на хищните акари се дели на идиосома и гнатосома. Липсва ясно разграничение на идиосомата на просома (глава) и опистосома (коремче). Гнатосомата (главогръден щит) съдържа средствата за хранене като педипалпите и хелицерите. Хелицерите са разтроени и имат зъбци с различна форма. Освен за поглъщане мъжките използват хелицерите си главно за прехвърляне на сперматофорите към женските. Идиосомата е покрита почти изцяло от дорзален щит. Голяма част от идиосомата на женския индивид е заета от органите за размножение, които са особено различни малко преди яйцепологането. Вентрално могат да бъдат намерени два щита — гръден и генитален. Всички крака имат четинки и шипове. Четинките на краката се използват за опора при движение във и по повърхността на почвата. Първата двойка крака се използва главно като антени. Втора двойка крака се използва не само за придвижване, но също така за захващане на жертвата. Шиповете на четвъртата двойка крака могат да служат за защита, както и като „двигател“ (28). Мъжките са с дължина от 0,55 до 0,65 mm и с тегло от 10—15 µg. Женските са с дължина от 0,8 до 0,9 mm и с тегло от 50—60 µg (8) (28) (фиг. 1).

Фигура 1:

Женски индивид, мъжки индивид, протонимфа и ларви на *H. aculeifer*.



При 23 °C акарите достигат полова зрялост съответно след 16 дни (при женските) и 18 дни (при мъжките) (6). Женският индивид прехвърля сперматофора през гениталния отвор, откъдето той достига до семеприемника. В семеприемника сперматозоидите узряват и се съхраняват. Оплождането се извършва едва след узряването на сперматозоидите в семеприемника. Оплодените или неоплодените яйца се полагат от женските слепени или отделно, за предпочитане в пукнатини или дупки. От копулиралите женски се раждат ювенилни индивиди и от двата пола, докато от яйцата от некопулиралите женски се излюпват само мъжки ювенилни индивиди. За достигането до етапа на полова зрялост индивидът преминава през четири фази на развитие (яйца — ларви, ларви — протонимфа, протонимфа — дейтонимфа, дейтонимфа — полово зрял индивид).

Яйцето е млечнобяло, прозрачно, елипсовидно и с дължина приблизително 0,37 mm, с твърда обвивка. Според (8) ларвите са с размер между 0,42 и 0,45 mm. Те имат само три двойки крака. В областта на главата са развити педипалпите и хелицерите. Хелицерите се използват за излюпване от яйцето, тъй като разполагат с няколко малки зъбци. Протонимфите се развиват след първото линеене, 1-2 дни след излюпването. Те също така са

▼ M6

с бял цвят, с размери 0,45-0,62 mm (8) и имат четири двойки крака. Зъбците са изцяло налични върху хелицерите. От горепосочения стадий акарите започват да търсят храна. За тази цел кутикулата на жертвата се пробива с хелицерите и в жертвата се изпуска секреция за извънтелесно смилане. След това хранителната каша може да бъде всмукана от акара. хелицерите могат също да се използват за откъсване на по-големи частици от късовете храна (28). След още едно линеене се развиват дейтонимфи. Те са с размери 0,60-0,80 mm (8) и с жълт до светлокафяв цвят. Със започването на тази фаза те могат да бъдат разделени на женски и мъжки. След още едно линеене, през времето на което индивидите са неактивни и се развива кафявият щит (приблизително след 14 дни) акарите стават полово зрели (възрастни) индивиди (28) (29) (30). Техният жизнен цикъл е между 48 и 100 дни при 25 °C (27).

▼ M6

Допълнение 8

Обобщение и времеви график за основните действия, които трябва да бъдат предприети с оглед извършване на изпитването с *Hydroaspis*

Време (дни) начало на изпитването = ден 0	Дейност/Задача
Ден – 35 до – 28	Прехвърляне на женските индивиди от изходната култура в чисти съдове за започване на синхронизацията 2 дни по-късно: отстраняване на женските два или три пъти в седмицата: даване на достатъчни количества храна
Ден – 5 (+/- 2)	Подготовка на изкуствена почва
Ден – 4 (+/- 2)	Определяне на СЗВ на изкуствената почва Изсушаване през нощта На следващия ден: претегляне на пробите и изчисляване на СЗВ
Ден – 4 (+/- 2)	Предварително навлажняване на изкуствената почва за постигане на 20-30 % от СЗВ
Ден 0	Начало на изпитването: изпитваният химикал се добавя към изкуствената почва Във всяко повторение се въвеждат 10 женски Всяко повторение се претегля Приготвят се абиотични контроли за съдържание на влага и рН, 2 повторения за всяко третиране Контролите за съдържание на влага се изсушават през нощта На следващия ден: контролите за съдържание на влага се претеглят На следващия ден: измерва се рН на изсушените абиотични контроли
Ден 3, 6, 9, 12 (приблизително)	Във всяко повторение се осигуряват достатъчно организми, представляващи жертви Всяко повторение се претегля и евентуално се добавя вода за компенсиране на изпарената
Ден 14	Изпитването се приключва, подготвя се извличането, с всички повторения плюс контролите за ефикасността на извличането Контролите за съдържание на влага се изсушават през нощта На следващия ден: Контролите за съдържание на влага се претеглят На следващия ден: измерва се рН на изсушените контроли
Ден 16	Приключва се извличането
Ден 16 +	Записва се броят на полово зрелите и ювенилните екземпляри в извлечения материал Резултатите се протоколират в таблици по образец Процедурата на изпитването се протоколира в листовите за протоколиране на изпитването.

▼ M6

В.37. 21-ДНЕВНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА РИБИ: КРАТКОСРОЧЕН СКРИНИНГ ЗА ЕСТРОГЕННА АКТИВНОСТ, АНДРОГЕННА АКТИВНОСТ И ПОТИСКАНЕ НА АРОМАТАЗАТА

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 230 (2009). Необходимостта от разработване и валидиране на изследване, позволяващо откриване на някои ендокринно активни химикали, произлиза от загрижеността, че нивата на химикали в околната среда могат да причинят неблагоприятни въздействия както за хората, така и за дивата флора и фауна, поради взаимодействието на тези химикали с ендокринната система. През 1998 г. ОИСП стартира с висок приоритет дейност по преразглеждане на съществуващите Насоки за изпитване и по разработване на нови Насоки за изпитване за скрининг и изпитвания за потенциални нарушители на функциите на ендокринната система. Един от елементите на дейността бе да се разработи насока за изпитване за скрининг на химикали, активни в ендокринната система на риби. 21-дневното скринингово изследване на ендокринната система на риби премина на обширна програма за валидиране, състояща се от междулабораторни изследвания с подобрени химикали, за доказване уместността и надеждността на анализа за откриване на химикали, потискащи естрогенната активност и ароматазата (1, 2, 3, 4, 5) в трите изследвани вида риби (*Pimephales promelas*, японска оризия и зеброво данио); откриването на андрогенна активност е възможно при *Pimephales promelas* и японска оризия, но не при зеброво данио. Настоящият метод за изпитване не позволява откриването на антиандрогенни химикали. Работата по валидирането е преминала през партньорска проверка от група от експерти, назначени от националните координатори на Програмата за насоки за изпитване (6). Изследването не е предназначено за идентифициране на специфични механизми на хормонални нарушения, тъй като изпитваните животни имат интактна хипоталамус-хипофиза-гонадна ос (ХХГ ос), която може да реагира на химикали, оказващи въздействие върху ХХГ оста на различни равнища. Краткосрочно изследване на размножаването при риби (ОИСП TG 229) включва плодовитостта и, по целесъобразност, хистопатологията на гонадите за *Pimephales promelas*, както и всички крайни точки, включени в настоящия метод за изпитване. Насоки за изпитване № 229 на ОИСП предоставят скрининг на химикали, които въздействат върху размножаването чрез различни механизми, в това число ендокринни механизми. Това следва да бъде взето предвид преди избора на най-подходящия метод за изпитване.
2. Настоящият метод за изпитване описва скринингово изследване *in vivo*, при което полово зрели мъжки и хвърлящи хайвер женски индивиди се държат заедно и се експонират на даден химикал през ограничена част от жизнения им цикъл (21 дни). При приключване на 21-дневния период на експозиция в зависимост от използвания биологичен вид като крайни точки се измерват един или два биомаркера в мъжки и женски индивиди, в качеството им на показатели за естрогенна активност, потискане на ароматазата или андрогенна активност на изпитвания химикал; тези крайни точки са вителогенин и вторични полови белези. Вителогенин се измерва в *Pimephales promelas*, японска оризия и зеброво данио, докато вторични полови белези се измерват само в *Pimephales promelas* и японска оризия.
3. Настоящото биологично изследване служи като скринингово изследване *in vivo* за някои ендокринни механизми на действие и неговото прилагане следва да се разглежда в контекста на „Концептуалната рамка на ОИСП за изпитване и оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система“ (28).

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

4. Вителогенинът (VTG) обикновено се произвежда от черния дроб на женски яйценосни гръбначни животни в отговор на циркулиращия ендогенен естроген. Той е прекурсор на белтъците в яйчния жълтък и след образуването си в черния дроб преминава в кръвообращението, откъдето стига до яйчника и там се модифицира в образуващия се хайвер. Вителогенинът е почти неоткриваем в плазмата на незрели женски и мъжки риби поради липса на достатъчно циркулиращ естроген; черният дроб обаче може да синтезира и секретира VTG в отговор на външно естрогенно стимулиране.

▼ M6

5. Измерването на VTG служи за откриване на химикали с различни естрогенни механизми на действие. Откриването на химикали с естрогенно действие е възможно чрез измерване на индуцирането на VTG в мъжки риби, и е много добре документирано в научната литература, преминала през партньорска проверка (напр. (7)). Индуцирането на VTG е доказано и след експозиция на андрогени, които могат да се ароматизират (8, 9). Намалването на равнището на циркулиращ естроген в женските животни, например посредством инхибиране на ароматазата, превръщаща ендогенния андроген в природния естроген 17 β -естрадиол, води до намаляване на нивото на VTG, което се използва за откриване на химикали, притежаващи свойства на инхибитори по отношение на ароматазата (10, 11). Биологичната значимост на отговора с VTG след естрогенно/ароматазно инхибиране е установена и е широко документирана. Възможно е обаче образуването на VTG в женски животни да е също така повлияно от обща токсичност и начини на токсично действие, различни от ендокринните, напр. хепатотоксичност.
6. Успешно са разработени и стандартизирани за рутинна употреба няколко метода за измерване. Такъв е случаят със специфичните за отделните видове ензимно-свързани имуносорбентни анализи (ELISA), използващи имунохимия за количествено определяне на получавания VTG в малки проби от кръв или черен дроб, взети от отделните риби (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Проби за измерване на VTG се вземат от кръв от *Pimephales promelas*, кръв или хомогенат глава/опашка от зеброво данио и черен дроб от японска оризия. При японската оризия е налице добра корелация между VTG, измерен от кръв и от черен дроб (19). В допълнение 6 са дадени препоръчителните процедури за събирането на проби за анализ на VTG. Комплектите за измерване на VTG са широко разпространени; такива комплекти следва да се основават на валидиран специфичен за отделните видове ELISA метод.
7. Вторичните полови белези в мъжки екземпляри от някои видове риби са видими външно, количествено определяеми и чувствителни към нивата на циркулиращите ендогенни андрогени; такъв е случаят с *Pimephales promelas* и японската оризия, но не и със зебровото данио, което не притежава количествено определяеми вторични полови белези. Женските запазват способността си за развиване на мъжки вторични полови белези, когато са експонирани на андрогенни химикали във вода. В научната литература са на разположение няколко проучвания, документиращи този тип отговор в *Pimephales promelas* (20) и японската оризия (21). Намалването при вторични полови белези у мъжките индивиди следва да се тълкува внимателно поради неголямата статистическата мощност, и следва да се основава на експертна оценка и определяне на значимостта на доказателствения материал. Съществуват ограничения за използването на зебровото данио в настоящото изследване поради липсата на количествено определяеми вторични полови белези, реагиращи на андрогенно активни химикали.
8. При *Pimephales promelas* основният показател за външна андрогенна експозиция е броят на размножителните туберкули, разположени по муцуната на женския индивид. При оризията броят на папиларните израстъци представлява основният маркер на екзогенна експозиция на андрогенни химикали при женските риби. Допълнение 5А и допълнение 5Б посочват препоръчаните процедури, които трябва да се спазват при оценката на половите белези съответно при *Pimephales promelas* и оризията.
9. Определенията, използвани за този метод за изпитване, са дадени в Допълнение 1.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

10. В рамките на изследването мъжки и женски риби, способни на размножаване, се експонират заедно в съдове за изпитване. Техният статус на полово зрели и способни на размножаване индивиди позволява ясното разграничаване на половете и следователно дава възможност за свързан с пола анализ на всяка крайна точка, и гарантира тяхната

▼ **M6**

чувствителност към външни химикали. При завършване на изпитването полът се потвърждава с микроскопско изследване на гонадите след отваряне на корема с ножици. Преглед на съответните условия на биологичното изследване е даден в допълнение 2. Изследването обикновено започва с риби, пробозети от популация, която е в състояние на хвърляне на хайвер; застаряващи индивиди не следва да се използват. Указания относно възрастта на рибите и репродуктивния им статус са дадени в раздела за подбора на риби. Изпитването се провежда, като се използват три концентрации на експозиция на химикал, както и контрола на вода и, ако е необходимо, контрола на разтворител. При оризията и зебровото данио се използват два съда или повторения на третиране (всеки съд съдържа 5 мъжки и 5 женски), а при *Pimephales promelas* се използват четири съда или повторения на третиране (всеки съд съдържа 2 мъжки и 4 женски). Това е така с цел приспособяване към териториалното поведение на мъжките при *Pimephales promelas*, като се поддържа достатъчна мощност на изследването. Експозицията се провежда в продължение на 21 дни и вземане на проби от риби се извършва на 21-ия ден от експозицията.

11. При вземането на проби на 21-ия ден от експозицията животните се умъртвяват по хуманен начин. Вторичните полови белези се измерват при *Pimephales promelas* и японската оризия (виж допълнение 5А и допълнение 5Б); кръвни проби за определяне на VTG се вземат от зебровото данио и *Pimephales promelas*, като алтернатива хомогенат глава/опашка може да се вземе от зебровото данио за определяне на VTG (допълнение 6); черен дроб за анализа на VTG се взема от оризията (допълнение 6).

КРИТЕРИИ ЗА ПРИЕМАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

12. За да са приемливи резултатите от изпитването, се прилагат следните условия:
- Смъртността в контролите на вода (или на разтворител) не трябва да надвишава 10 % в края на периода на експозиция;
 - концентрацията на разтворен кислород трябва да бъде най-малко 60 % от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух (ASV) по време на периода на експозиция;
 - температурата на водата трябва да се различава с не повече от $\pm 1,5$ °C между съдовете за изпитване по всяко време на периода на експозиция, и се поддържа в диапазон от 2 °C в рамките на температурните диапазони, посочени за изпитваните видове (допълнение 2).
 - следва да бъдат на разположение доказателства, че концентрацията на изпитвания химикал в разтвора е била задоволително поддържана в рамките на ± 20 % от усреднените измерени стойности. chemical

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**Апаратура**

13. Обикновено лабораторно оборудване и специално следното:
- а) устройства за измерване на съдържанието на кислород и рН-метри;
 - б) оборудване за определяне твърдост и алкалност на водата;
 - в) подходяща апаратура за контрол на температурата и за предпочитане продължителен мониторинг;
 - г) съдове, направени от химични инертни материали и с подходящ капацитет по отношение на препоръчителната гъстота на зареждане и отглеждане (вж. допълнение 2);
 - д) субстрат за хвърляне на хайвер за *Pimephales promelas* и зебровото данио, допълнение 4 съдържа необходимите подробности;
 - е) подходящи точни везни (т.е. точност до $\pm 0,5$ mg).

▼ M6**Вода**

14. Всяка вода, в която изпитваният вид показва съответните признаци за дългосрочно преживяване и растеж, може да се използва като вода за изпитването. Необходимо е постоянно качество на водата по време на изпитването. Стойността на рН на водата следва да е от 6,5 до 8,5, но по време на дадено изпитване трябва да е в диапазон $\pm 0,5$ рН единици. За да се гарантира, че водата за разреждане няма да повлияе неправилно върху резултата от изпитването (например чрез образуване на комплекс с изпитвания химикал), пробите за анализ следва да се вземат на интервали. Правят се измервания на тежки метали (например Cu, Pb, Zn, Hg, Cd и Ni), основни аниони и катиони (например Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , и SO_4^{2-}), пестициди (например общо органофосфорни и общо органохлорни пестициди), общ органичен въглерод и суспендирани твърди частици, например на всеки три месеца, когато се знае, че водата за разреждане има относително постоянно качество. Ако е показано, че качеството на водата е постоянно поне за период, по-голям от една година, определянията могат да се правят по-рядко и да се увеличат интервалите (например на всеки шест месеца). Някои от химичните характеристики на водата за разреждане са изброени в допълнение 3.

Разтвори за изпитване

15. Разтворите за изпитване при избраните концентрации се приготвят чрез разреждане на изходен разтвор. Изходният разтвор се приготвя за предпочитане чрез просто смесване и разбъркване на изпитвания химикал във водата за разреждане с помощта на механични средства (например разклащане или ултрасонификация). За постигане на подходящо концентриран изходен разтвор могат да се използват колони за насищане (колони за разтворимост). Използването на разтворител за носител не е препоръчително. Независимо от това, в случай че е необходим разтворител, успоредно следва да се проведе изпитване на контрола на разтворител, при същата концентрация на разтворител, като тази при третиранията с химикала. За трудно разтворими изпитвани химикали е възможно разтворителят да бъде технически най-доброто решение; Следва да се консултира Ръководството на ОИСР с насоки за изпитване за токсичност във водна среда на трудни вещества и смеси (22). Изборът на разтворител се определя в зависимост от химичните свойства на химикала. Ръководството на ОИСР препоръчва максимум от 100 µl/l, което следва да се спазва; Независимо от това неотдавнашен преглед (23) подчерта допълнителни проблеми при използването на разтворители за изпитване на ендокринна активност. Поради това се препоръчва концентрацията на разтворителя, ако е необходим, да бъде сведена до минимум, когато това е технически осъществимо (в зависимост от физичните и химичните свойства на изпитвания химикал).
16. Използва се проточна система за изпитване. Такава система постоянно подава и разрежда изходен разтвор на изпитвания химикал (например система с измерваща помпа, пропорционално разреждащо устройство, сатуратор), за да се подават серии от концентрации към камерите за изпитване. Параметрите на потока на изходния разтвор и водата за разреждане следва да се проверяват на интервали, за предпочитане всеки ден по време на извършването на изпитването, и през това време не следва да се променят с повече от 10 %. Трябва внимателно да се избягва използването на нискокачествени пластмасови тръби или други материали, които могат да съдържат биологично активни химикали. При избора на материали за проточната система трябва да бъде взета под внимание възможна адсорбция на изпитвания химикал в този материал.

Отглеждане на рибата

17. Рибата за изпитването следва да се избира от лабораторна популация, за предпочитане от едно и също потомство, която е била аклиматизирана в продължение на поне две седмици преди изпитването, при условия, свързани с качеството на водата и осветлението, подобни на тези, използвани при изпитването. Важно е скоростта на зареждане и гъстотата на отглеждане (за определения, виж допълнение 1) да са подходящи за използваните за изпитването видове (вж. допълнение 2).
18. След 48-часов период на свикване се отчита смъртността и се прилагат следните критерии:

▼ **M6**

- при смъртност, по-голяма от 10 % от популацията за седем дни: отхвърля се цялата партида;
 - при смъртност между 5 % и 10 % от популацията: аклиматизация за нови седем дни; ако смъртността е повече от 5 % през вторите седем дни, се отхвърля цялата партида;
 - при смъртност по-малко от 5 % от популацията за седем дни: партидата се приема
19. По време на аклиматизационния период, в периода преди експозицията или по време на периода на експозиция рибата не следва да бъде лекувана от заболявания.

Период преди експозицията и подбор на риби

20. Препоръчва се едноседмичен период преди експозицията, в който животните се поставят в съдове, подобни на съдовете при действителното изпитване. Рибите следва да бъдат хранени *ad libitum* през време на периода на отглеждане и по време на фазата на експозиция. Фазата на експозиция започва с полово диморфни възрастни риби от лабораторна доставка на зрели животни, способни на размножение (напр. с ясно видими вторични полови белези що се отнася до *Pimephales promelas* и японската оризия) и активно хвърлящи хайвер. Само за общ ориентир (и без да се разглежда изолирано от наблюдаването на настоящия репродуктивен статус на дадена партида от риби), *Pimephales promelas* трябва да бъде на възраст приблизително 20 (\pm 2) седмици, като се приема, че рибите от този вид са били отглеждани при 25 ± 2 °C през жизнения им цикъл. Японската оризия трябва да бъде на възраст приблизително 16 (\pm 2) седмици, като се приема, че рибите от този вид са били отглеждани при 25 ± 2 °C през жизнения им цикъл. Зебровото данио трябва да бъде на възраст приблизително 16 (\pm 2) седмици, като се приема, че рибите от този вид са били отглеждани при 26 ± 2 °C през жизнения им цикъл.

ПЛАНИРАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

21. Използват се три концентрации на изпитвания химикал, една контрола (вода) и, ако е необходимо, една контрола на разтворител. Данните могат да бъдат анализирани, за да се определят статистически значими разлики между отклиците в третираните и контролите. Тези анализи ще дадат информация дали, вместо за употреба при оценка на риска, не се изисква по-нататъшно по-дългосрочно изпитване за неблагоприятни последици (а именно преживяване, развитие, растеж и размножение) (24).
22. За зебровото данио и оризията, в ден 21 на опита се пробовземат мъжки и женски животни от всяко ниво на третиране (5 мъжки и 5 женски животни във всяко от двете повторения) и от контролата(ите), за измерване на VTG и вторични полови белези, където е приложимо. За *Pimephales promelas* в ден 21 на опита се пробовземат мъжки и женски животни (2 мъжки и 4 женски животни във всяко от четирите повторения) и от контролата(ите), за измерване на VTG и вторични полови белези.

Избор на концентрации на изпитване

23. За целите на това изпитване най-високата изпитвана концентрация трябва да се определя от максимално поносимата концентрация (МПК), определена при изпитване за определяне на обхвата, или от други данни за токсичност, или 10 mg/l, или максималната разтворимост във вода, в зависимост от това коя е най-ниска. МПК се определя като най-високата изпитвана концентрация на химикала, която води до по-малко от 10 % смъртност. При използването на този подход се допуска, че са налице емпирични данни за смъртността от остра и друга токсичност, от които може да се оцени МПК. Оценката на МПК може да бъде неточна и обикновено се изисква определена професионална преценка.

▼ **M6**

24. Изискват се три изпитвани концентрации, раздалечени на равни интервали една от друга с кратност, която не надвишава 10, и контрола на вода за разреждане (както и контрола на разтворител, ако е необходимо). Препоръчва се раздалечаване с кратност между 3,2 и 10.

ПРОЦЕДУРА**Подбор и измерване теглото на изпитваните риби**

25. Важно е варирането в теглото на рибите в началото на изпитването да се сведе до минимум. Подходящи диапазони на размерите за различните видове, които се препоръчват за използване в настоящото изпитване, са дадени в допълнение 2. За цялата партида от риби, използвани в изпитването, стойностите на индивидуалните тегла в началото на изпитването следва да се запазят в $\pm 20\%$ от средноаритметичното тегло на рибите от същия пол. Препоръчва се да се измерва и теглото на подпроба от рибното потомство преди изпитването с цел да се оцени средното тегло.

Условия на експозиция*Продължителност*

26. Продължителността на теста е 21 дни, след период преди експозицията. Препоръчаният период преди експозицията е една седмица.

Хранене

27. Рибите следва да бъдат хранени *ad libitum* с подходяща храна (приложение 2) в достатъчно количество за поддържане на телесното състояние. Следва да се полагат грижи за избягване на развитието на микроби и на мътност на водата. Като обща насока дневната порция може да бъде разделена на две или три равни части за многократно ежедневно хранене, с поне три часа между всяко хранене. Еднократна по-голяма порция е приемлива, особено за съботите и неделите. Даването на храна се прекратява 12 часа преди пробовземането/аутопсията.
28. Храната за риби следва да бъдат оценявана за наличието на замърсители, като например органохлорни пестициди, полициклични ароматни въглеродороди (РАН), полихлорирани бифенили (РСВ). Храна с повишени нива на фитоестрогени, които биха нарушили отклика при изследването с познати естрогенни агонисти (напр. 17-бета-естрадиол) следва да се избягва.
29. Неконсумираната храна и фекалните отпадъци следва да се отстраняват от съдовете за изпитване най-малко два пъти седмично, напр. чрез внимателно почистване на дъното на всеки съд, с използване на сифон.

Светлина и температура

30. Продължителността на излагане на светлина и температурата на водата следва да са подходящи за изпитваните видове (допълнение 2).

Честота на аналитичните определяния и измервания

31. Преди започване на периода на експозиция следва да бъде гарантирано правилното функциониране на системата за доставяне на химикала. Всички необходими методи за анализ следва да бъдат установени, включително с достатъчно информация за стабилността на химикала в системата за изпитване. По време на изпитването концентрациите на изпитвания химикал се определят през постоянни интервали, както следва: дебитът на изходните разтвори на водата за разреждане и на токсичния химикал следва да се проверяват, за предпочитане ежедневно, но като минимум два пъти седмично и през време на изпитването не следва да се променят с повече от 10%. Препоръчва се действителните концентрации на изпитвания химикал да се измерват във всички съдове в началото на изпитването и след това на интервали от една седмица.
32. Препоръчва се резултатите да се основават на измерени концентрации. Обаче ако концентрацията на изпитвания химикал в развора е поддържана на задоволително ниво в рамките на $\pm 20\%$ от номиналната концентрация по време на изпитването, тогава резултатите могат да се основават или на номиналната, или на измерената стойност.
33. Възможно е да се наложи филтруване (напр. с използване на отвори с размер 0,45 μm) или центрофугиране на пробите. Ако е необходимо, центрофугирането се препоръчва като процедура. Обаче в случай че изпитваният материал не се адсорбира от филтрите, филтруването също може да е приемливо.

▼ **M6**

34. По време на изпитването разтвореният кислород, температурата и рН следва да бъдат измервани във всеки съд за изпитване най-малко веднъж седмично. Общата твърдост и алкалността следва да се измерват в контролите и в един съд с най-висока концентрация най-малко веднъж седмично. За предпочитане е температурата да се наблюдава непрекъснато най-малко в един съд за изпитване.

Наблюдения

35. По време на изследването или при приключването му се оценяват редица общи (напр. преживяване) или ключови биологични отклици (напр. нива на VTG). Измерването и оценката на тези крайни точки и ползата от тях са описани по-долу.

Преживяване

36. Рибите следва да се преглеждат всеки ден през периода на изпитването и всякаква смъртност следва да се записва, а мъртвите екземпляри се отстраняват колкото е възможно по-бързо. Мъртвите риби не следва да се заменят нито в съдовете с контроли, нито в съдове за третиране. Полът на рибите, които умират по време на изпитването, трябва да се определи чрез макроскопска оценка на гонадите.

Поведение и външен вид

37. Всяко необичайно поведение (в сравнение с контролите) трябва да бъде отбелязвано; това може да включва признаци на обща токсичност, включително хипервентилация, некоординирано плуване, загуба на равновесие, и нетипично състояние на покой или нетипично поведение при хранене. Освен това следва да бъдат отбелязвани и външните аномалии (като кръвоизлив, обезцветяване). Такива признаци на токсичност следва да се разглеждат внимателно при интерпретирането на данните, тъй като те могат да сочат концентрации, при които биомаркерите за ендокринна активност не са надеждни. Такива наблюдения на поведението могат също да предоставят полезна качествена информация за потенциалните бъдещи изисквания за изпитвания на риби. Така например териториалната агресивност при нормални мъжки или при женски, придобили мъжки вторични полови белези, е наблюдавана при *Pimephales promelas* при андрогенна експозиция; При зебровото данио характерното поведение при чифтосване и хвърляне на хайвера, проявяващо се непосредствено след изгрев, се ограничава или се възпрепятства от естрогенна или антиандрогенна експозиция.
38. Тъй като някои аспекти на външния вид (предимно цветът) могат да се променят бързо при боравенето, важно е качествените наблюдения да бъдат извършени преди отстраняването на животните от системата за изпитване. От досегашния опит с *Pimephales promelas* се предполага, че някои ендокринно активни химикали може първоначално да предизвикат промени в следните външни характеристики: оцветяване на тялото (светло или тъмно), начини на оцветяване (наличие на вертикални ленти) и форма на тялото (главата и гръдната област). Поради това наблюденията на външния вид на рибите следва да бъдат правени по време на изпитването и при приключване на изследването

Умъртвяване на риби по хуманен начин

39. На ден 21, т.е. при приключване на експозицията, рибите следва да бъдат подложени на евтаназия с подходящи количества трикаин (трикаинов метансулфонат, метаканн, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l буферизиран с 300 mg/l NaHCO₃ (натриев хидрогенкарбонат, CAS 144-55-8), за да се намали дразненето на мукозните мембрани; след това се вземат проби от кръв или тъкани за определяне на вителогенин, както е обяснено в раздела за витогенин.

▼ **M6***Наблюдение на вторични полови белези*

40. Някои химикали с активно действие върху ендокринната система могат да предизвикат промени в специализирани вторични полови белези (брой размножителни туберкули при мъжки *Pimephales promelas*, броят на папиларните израстъци при оризията от мъжки пол). Следва да се отбележи, че химикали с известни начини на действие могат да са причина за аномална проява на вторични полови белези при животни от противоположния пол; например агонисти на андрогенните рецептори като например тренболон, метилтестостерон и дихидротестостерон, могат да предизвикат поява на подчертано развити размножителни туберкули у женски *Pimephales promelas*, или развитие на папиларни израстъци при оризията от женски пол (11, 20, 21). Протоколирано е също, че агонисти на естрогенните рецептори могат да намалят броя на размножителните туберкули и размера на дорзалните отлагания на колаген при полово зрели мъжки индивиди (25, 26). Такива макроскопски наблюдения на морфологията могат да предоставят полезна качествена информация за потенциалните бъдещи изисквания за изпитвания на риби. Броят и размерът на размножителните туберкули при *Pimephales promelas* и папиларните израстъци при оризията могат да бъдат количествено определени директно или, по-практично, в консервирани екземпляри. Препоръчаните процедури за оценка на вторични полови белези при *Pimephales promelas* и при оризията са на разположение съответно в допълнение 5А и допълнение 5Б.

Вителогенин (VTG)

41. Пробовземането на кръв се извършва от опасната артерия/вена с хепаринизирана микрокапилярка за хематокрит или, като алтернативен вариант, чрез сърдечна пункция със спринцовка. В зависимост от размера на рибата обемът на кръвта за пробовземане обикновено варира между 5 и 60 μl на индивид за *Pimephales promelas* и 5-15 μl на индивид за зеброво данио. Плазмата се отделя от кръвта чрез центрофугиране и се съхранява с протеазни инхибитори при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до анализа за вителогенин. Като алтернатива, при оризията се използва черният дроб, а при зебровото данио като източник на тъкан за определяне на VTG може да се използва хомогенат глава/опашка (допълнение 6). Измерването на VTG следва да се основава на валидиран хомоложен ELISA метод, като се използва хомоложен VTG стандарт и хомоложни антитела. Препоръчва се използването на метод, който позволява да се открият нива VTG от порядъка на няколко ng/ml плазма (или ng/mg тъкан), което е фоновото ниво при неекспонирани мъжки риби.
42. Контролът на качеството на анализа на VTG се извършва чрез използването на еталони, празни проби и анализи с най-малко две повторения. За всеки ELISA метод следва да се проведе изпитване за матричен ефект (ефект на разреждане на пробата), за да се определи минималният коефициент на разреждане на пробата. Всяка ELISA плака, използвана за изследвания на VTG, следва да включва следните проби за контрол на качеството: най-малко 6 еталона за калибриране, покриващи диапазона от очаквани концентрации на VTG, и поне една празна проба за изследване за неспецифично свързване (анализ в две повторения). Абсорбцията при тези празни проби следва да е по-малко от 5 % от максималната абсорбция на еталона за калибриране. Следва да се анализират най-малко две аликвотни части (две повторения в отделни гнезда) от всяко разреждане на проба. Повторенията в отделни гнезда, които се различават с повече от 20 %, следва да бъдат анализирани повторно.
43. Коефициентът на корелация (R^2) за калибрационните криви трябва да бъде по-голям от 0,99. Независимо от това, високата корелация не е достатъчна, за да гарантира достатъчно прогнозиране на концентрацията във всички диапазони. В допълнение към достатъчно високата степен на корелация за калибрационната крива, концентрацията на всеки еталон, както е изчислена от калибрационната крива, следва да попада между 70 и 120 % от неговата номинална концентрация. В случай, че трендът на номиналните концентрации се

▼ **M6**

отдалечава от тренда на регресионната линия (напр. при по-ниски концентрации), може да е необходимо калибрационната крива да се раздели на ниски и високи диапазони, или да се използва нелинеен модел за подходящо изглаждане на данните от абсорбцията. Ако кривата е раздвоена, и двата линейни участъка следва да са с $R^2 > 0,99$.

44. Границата на откриване (LOD) се определя като границата, под която концентрацията е твърде ниска за откриване на веществото, а границата на количествено определяне (LOQ) се определя като границата, под която концентрацията е твърде ниска за откриване на веществото, умножена по най-ниския коефициент на разреждане.
45. Всеки ден, в който се извършват изпитвания за VTG, се анализира проба с внесена добавка с използване на еталон, който е референтен между различни изследвания (допълнение 7). Отношението на очакваната концентрация към измерената концентрация се протоколира заедно с резултатите от всеки набор от изследвания от този ден.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Оценка на отклиците на биомаркерите чрез дисперсионен анализ (ANOVA)**

46. За идентифициране на потенциална ендокринна активност на даден химикал се сравняват отклиците между третираните и контролните групи с помощта на дисперсионен анализ (ANOVA). Когато се използва контрола на разтворител, за всяка крайна точка следва да се приложи подходящ статистически тест между контролите на вода за разреждане и на разтворител. Насоки за работата с данните за контролите на вода за разреждане и на разтворител при последващия статистически анализ могат да се намерят в източник OECD, 2006с (27). Всички биологични данни, свързани с отклици, следва да се анализират и протоколират отделно по пол. Ако изискваните допускания за използване на параметричен метод не са изпълнени — не е налице нормалност на разпределението (например тест на Шапиро-Уилк) или дисперсията е хетерогенна (тест на Бартлет или тест на Левин), преди извършването на ANOVA следва да се разгледа трансформиране на данните с оглед хомогенизиране на дисперсията, или извършване на ANOVA с претеглени средни. За немонотонна зависимост доза-отклик могат да се използват тестът на Дънет (параметричен) върху множествени сравнения по двойки, или тестът на Ман-Уитни с корекция на Бонферони (непараметричен). Ако зависимостта е приблизително монотонна, могат да се използват други статистически тестове (напр. тестът на Йонкхере-Терпстра или тестът на Уйлямс). За подпомагане при вземането на решение относно използването на най-подходящия статистически тест в допълнение 8 е представена статистическа блокова схема. Допълнителна информация може да бъде получена също и от документа на ОИСР „Съвременни подходи за статистически анализ на данни за екоотоксичност“ (27).

Протоколиране на резултатите от изпитването

47. Данните от изследването следва да включват:

Извършваща изпитвания лаборатория:

- Отговорен персонал и неговите отговорности, свързани с изследването
- Всяка лаборатория трябва да е показала компетентността си чрез използване на набор от представителни химикали

Изпитван химикал:

- Характеризиране на изпитвания химикал (chemical)
- Физична природа и относими физични и химични свойства

▼ M6

- Метод и честота на приготвяне на изпитваните концентрации
- Информация за стабилността и биоразградимостта

Разтворител:

- Характеристика на разтворителя (естество, използвана концентрация)
- Обосновка за избора на разтворителя (когато разтворителят е различен от вода)

Изпитвани животни:

- Биологични видове и щам
- Доставчик и специални съоръжения на доставчика
- Възрастта на рибите в началото на изпитването и репродуктивен статус/статус по отношение на хвърляне на хайвера
- Подробни данни за процедурата за аклиматизация на животните
- Телесно тегло на рибите в началото на експозицията (от подпроба от рибното потомство)

Условия на изпитване:

- Използвана процедура на изпитване (тип изпитване, скорост на разреждане, гъстота на отглеждане и т.н.);
- Метод за приготвяне на изходни разтвори и скорост на потока;
- Номиналните концентрации на изпитване, измерваните седмично концентрации на разтворите за изпитването и използвания аналитичен метод, средни величини на измерените стойности и стандартни отклонения в съдовете за изпитване, и доказателство, че измерванията се отнасят за концентрациите на изпитвания химикал (test chemical) в истински разтвор;
- Характеристиките на водата за разреждане (включително рН, твърдост, алкалност, температура, концентрация на разтворен кислород, нива на остатъци от хлор, общо съдържание на органичен въглерод, суспендирани твърди частици и всякакви други направени измервания)
- Качество на водата в съдовете за изпитване: рН, твърдост, температура и концентрация на разтворен кислород;
- Подробна информация за храненето (например вид на храната(ите), източник, дадено количество и честота, и анализи за съдържание на относими замърсители, ако са на разположение (напр. полихлорирани бифенили, полициклични ароматни въглеводороди и оргадохлорни пестициди).

Резултати

- Доказателство, че контролите отговарят на критериите за приемане на изпитването;
- Данни за смъртността при всички нива на концентрацията на изпитване и в контролите;
- Използваните техники за статистически анализ, обработка на данните и обосновка за използваните техники;
- Данни за макроскопски биологични наблюдения на морфологията, включително вторични полови белези и вителогенин;

▼ M6

- Резултати от анализите на данните, за предпочитане в таблична и графична форма;
- Проява на необичайни реакции от страна на рибите и всякакви видими въздействия, причинени от изпитвания химикал (chemical)

НАСОКИ ЗА ИНТЕРПРЕТИРАНЕТО И ПРИЕМАНЕТО НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

48. Този раздел съдържа някои съображения, които трябва да се вземат предвид при тълкуването на резултатите от изпитването за различните измерени крайни точки. Резултатите трябва да се интерпретират внимателно, когато изглежда, че изпитваният химикал предизвиква ясно изразено токсично действие или оказва въздействие върху общото състояние на животното.
49. При задаването на диапазона на изпитваните концентрации трябва да се внимава да не се превишава максималната поносима концентрация, за да се даде възможност за съдържателно интерпретиране на данните. Важно е да има поне едно третиране, при което не са налице признаци на токсично въздействие. Признаците на заболяване или на токсично въздействие следва да бъдат подробно оценявани и протоколирани. Например, възможно е образуването на VTG в женски животни да е също така повлияно от обща токсичност и начини на токсично действие, различни от ендокринните, напр. хепатотоксичност. Независимо от това, тълкуването на въздействията може да бъде подкрепено чрез други нива на третиране, които да не водят до невъзможност за разграничаване поради системна токсичност.
50. Има няколко аспекта, които трябва да бъдат взети предвид при приемането на резултатите от изпитването. Като насока, нивата на VTG в контролните групи мъжки и женски животни следва да бъдат разграничени и разделени от около три порядъка при *Pimephales promelas* и зебровото данио, и от около един порядък при оризията. Примери за диапазона на стойностите, които се срещат в контролните групи и в групите на третиране, могат да бъдат намерени в протоколите за валидиране (1, 2, 3, 4). Високите стойности на VTG в контролни мъжки екземпляри могат да поставят под съмнение реагирането на биологичното изследване и способността му да открива слаби естрогенни агонисти. Ниските стойности на VTG в контролни женски екземпляри могат да поставят под съмнение реагирането на биологичното изследване и способността му да открива инхибитори на ароматазата и естрогенни антагонисти. Изследванията за валидиране са били използвани за изготвянето на тези насоки.
51. Ако дадена лаборатория не е извършвала изследването преди това, или са направени съществени промени (например промяна на щам на рибите или доставчика), е целесъобразно да се проведе проучване на техническата компетентност. Препоръчва се да се използват химикали, които обхващат широк спектър от механизми на действие или въздействия върху някои от крайните точки от изпитването. На практика всяка лаборатория се насърчава да изгради собствени контролни данни за минали периоди за мъжките и женските индивиди, както и да извърши изпитване на химикал, представляващ положителна контрола за естрогенна активност (напр. 17 β -естрадиол при 100 ng/l, или известен слаб агонист), в резултат на което се увеличава VTG в мъжките риби, на химикал, представляващ положителна контрола за потискане на ароматазата (напр. фаздрозол или прохлораз при 300 μ g/l), в резултат на което се намалява VTG в женския индивид, и на химикал, представляващ положителна контрола за андрогенна активност (напр. 17 β -тренболон при 5 μ g/l), в резултат на което се индуцират вторични полови белези в женски *Pimephales promelas* и японска оризия. Всички тези данни могат да бъдат сравнявани с наличните данни от изследванията за валидиране (1, 2, 3), за да се гарантира компетентността на лабораторията.
52. Като цяло, измерванията на VTG следва да се считат за положителни, ако се наблюдава статистически значимо увеличаване на VTG при мъжките индивиди ($p < 0,05$), или статистически значимо намаление при женските индивиди ($p < 0,05$) най-малко при най-високата доза на изпитване, в сравнение с контролната група, и при липса на признаци за обща токсичност. Положителният резултат се подкрепя допълнително от доказване на биологически реалистична връзка между дозата и кривата на отклика. Както беше споменато по-горе, намалението на вителогенина може да не е изцяло с ендокринен произход; независимо от това положителният резултат по принцип следва да се тълкува като доказателство за ендокринна активност *in vivo* и обичайно следва да води до предприемане на действия за допълнително изясняване.

▼ M6

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.
- (2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.
- (3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.
- (4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (accessed 18/09/08).
- (5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.
- (6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.
- (7) Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*;103 Suppl 7:173-8 Review.
- (8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68(3):277-91.
- (9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343-52.
- (10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*;67(1):121-30.
- (11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.
- (12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.

▼ M6

- (13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.
- (14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131
- (16) Rose J, Holbech H, Lindholm C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 β -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C*. 131: 531-539.
- (17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- (18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang JJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87-98.
- (19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.
- (20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6): 1350-60.
- (21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3):774-81.
- (22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris
- (23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.69-92.
- (24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts“, not „traffic lights“, in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*;114 Suppl 1:106-14.
- (25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.

▼ M6

- (26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
- (27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MO-NO(2006)18
- (28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MO-NO(2012)22

▼ **M6**

Допълнение 1

Съкращения и определения

Химикал: Вещество или смес

CV: Коефициент на вариация.

ELISA: Ензимно-свързан имуносорбентен анализ.

Скорост на зареждане: Мокро тегло на рибите на обем вода.

Гъстота на отглеждане: Брой на рибите на обем вода.

VTG (вителогенин): Фосфогликопротеин, който е прекурсор на белтъците в яйчния жълтък и обикновено се среща в полово активните женски индивиди от всички яйценосни видове.

ХХГ ос: хипоталамус-хипофиза-гонадна ос.

МПК: Максимално поносима концентрация, която представлява около 10 % от LC₅₀.

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

▼ M6

Допълнение 2

Опитни условия за скрининговото изследване на ендокринната система при риби

1. Препоръчани видове	<i>Pimephales promelas</i>	Японска оризия (<i>Oryzias latipes</i>)	Зеброво данио (<i>Danio rerio</i>)
2. Тип изпитване	Проточно	Проточно	Проточно
3. Температура на водата	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Качеството на осветлението	Луминесцентни крушки (широк спектър)	Луминесцентни крушки (широк спектър)	Луминесцентни крушки (широк спектър)
5. Светлинен интензитет	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, или 50-100 ft-c (заобикалящи равнища на осветеност в лабораторията)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, или 50-100 ft-c (заобикалящи равнища на осветеност в лабораторията)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, или 50-100 ft-c (заобикалящи равнища на осветеност в лабораторията)
6. Фотопериод (преходните фази на разсъмване и здрач са по избор, но не се считат за необходими)	16 h светлина, 8 h тъмнина	12-16 h светлина, 12-8 h тъмнина	12-16 h светлина, 12-8 h тъмнина
7. Скорост на зареждане	< 5 g на l	< 5 g на l	< 5 g на l
8. Размер на камерата за изпитване	10 l (най-малко)	2 l (най-малко)	5 l (най-малко)
9. Обем на изпитвания разтвор	8 l (най-малко)	1,5 l (най-малко)	4 l (най-малко)
10. Обменени обеми на изпитвани разтвори	Най-малко 6 дневно	Най-малко 5 дневно	Най-малко 5 дневно
11. Възраст на изпитваните организми	Вж. точка 20	Вж. точка 20	Вж. точка 20
12. Приблизително мокро тегло на половозряла риба (g)	Женски: 1,5 ± 20 % Мъжки: 2,5 ± 20 %	Женски: 0,35 ± 20 % Мъжки: 0,35 ± 20 %	Женски: 0,65 ± 20 % Мъжки: 0,4 ± 20 %
13. Брой на рибите на съд за изпитване	6 (2 мъжки и 4 женски)	10 (5 мъжки и 5 женски)	10 (5 мъжки и 5 женски)
14. Брой третираня	= 3 (плюс подходящи контроли)	= 3 (плюс подходящи контроли)	= 3 (плюс подходящи контроли)
15. Брой съдове на третиране	най-малко 4	най-малко 2	най-малко 2
16. Брой на рибите на концентрация на изпитване	16 половозрепи женски и 8 мъжки (4 женски и 2 мъжки във всеки един съд с повторение)	10 половозрепи женски и 10 мъжки (5 женски и 5 мъжки във всеки един съд с повторение)	10 половозрепи женски и 10 мъжки (5 женски и 5 мъжки във всеки един съд с повторение)
17. Режим на хранене	Живи или замразени половозрепи артемии или науплии от артемии два или три пъти дневно (<i>ad libitum</i>), налични в търговската мрежа храни или комбинация от горепосочените	Науплии от артемии два или три пъти дневно (<i>ad libitum</i>), налични в търговската мрежа храни или комбинация от горепосочените	Науплии от артемии два или три пъти дневно (<i>ad libitum</i>), налични в търговската мрежа храни или комбинация от горепосочените

▼ M6

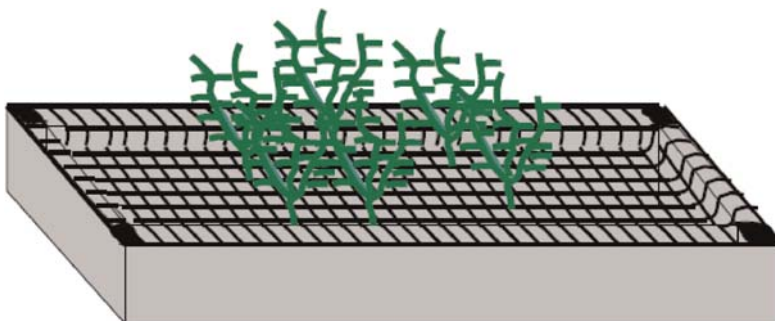
18. Аериране	Няма, освен в случаите, когато концентрацията на разтворения кислород падне под 60 % от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух	Няма, освен в случаите, когато концентрацията на разтворения кислород падне под 60 % от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух	Няма, освен в случаите, когато концентрацията на разтворения кислород падне под 60 % от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух
19. Вода за разреждане	Вода с чиста повърхност, кладенчова или възстановена вода или дехлорирана чешмяна вода	Вода с чиста повърхност, кладенчова или възстановена вода или дехлорирана чешмяна вода	Вода с чиста повърхност, кладенчова или възстановена вода или дехлорирана чешмяна вода
20. Период преди експозицията	препоръчват се 7 дни	препоръчват се 7 дни	препоръчват се 7 дни
21. Продължителност на експозицията на химикала	21 d	21 d	21 d
22. Биологични крайни точки	— преживяване - поведение - 2-ни полови белези - VTG	- преживяване - поведение - 2-ни полови белези - VTG	- преживяване - поведение - VTG
23. Приемливост на изпитването	Разтворен кислород > 60 % от стойността на насищане; средна температурата 25 ± 2 °C; 90 % преживели риби в контролите; измерени концентрации на изпитване в рамките на 20 % от средните измерени стойности на ниво на третиране.	Разтворен кислород > 60 % от стойността на насищане; средна температурата 24 ± 2 °C; 90 % преживели риби в контролите; измерени концентрации на изпитване в рамките на 20 % от средните измерени стойности на ниво на третиране.	Разтворен кислород > 60 % от стойността на насищане; средна температурата 26 ± 2 °C; 90 % преживели риби в контролите; измерени концентрации на изпитване в рамките на 20 % от средните измерени стойности на ниво на третиране.

▼ M6*Допълнение 3***Някои химични характеристики на приемлива вода за разреждане**

Съставка	Концентрации
Твърди частици	< 20 mg/l
Общ органичен въглерод	< 2 mg/l
Нейонизиран амоняк	< 1 µg/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

▼ **M6***Допълнение 4А***Субстрат за хвърляне на хайвер за зebрово дaниo**

Вана за хвърляне на хайвера: всякакви стъклени съдове за инструменти с примерни дължина 22 cm × ширина 15 cm × дълбочина 5,5 cm, покрити с отстранима телена решетка от неръждаема стомана (с ширина на отворите 2 mm). Решетката следва да покрива отвора на съда за инструменти на равнище, по-ниско от върха на съда.



Върху решетката следва да бъде фиксиран субстрат за хвърляне на хайвер. Той следва да представлява структура, в която рибите да могат да проникнат. Например, подходяща е изкуствена аквариумна растителност, изработена от зелен пластмасов материал (NB: следва да се обърне внимание на възможна адсорбция на изпитвания химикал върху пластмасовия материал). Пластмасата следва да бъде промита в достатъчно количество топла вода за период, достатъчен, за да се гарантира, че няма да преминат химикали във водата за изпитването. Когато се използват стъклени материали, следва да се гарантира, че при извършване на енергични движения рибите не се увреждат и не се притискат.

Разстоянието между ваната и стъклените стени трябва да бъде най-малко 3 cm, за да се гарантира, че хвърлянето на хайвер не се извършва извън ваната. Хвърленият във ваната хайвер попада през решетката и може да бъде пробовзет 45-60 min след началото на периода на осветление. Прозачните хайверни зърна не се слепват и могат лесно да бъдат преброени, като се използва напречно осветление. Когато се използват пет женски животни на съд, брой на хайверните зърна до 20 на ден може да се счита за нисък, до 100 за среден и над 100 за висок. Ваната за хвърляне на хайвер се отстранява, хайверните зърна се събират и ваната се поставя отново в съда за изпитване или възможно най-късно вечерта, или много рано сутринта. Времето до повторното поставяне не следва да надвишава един час, защото в противен случай е възможно сигналът от субстрата за хвърляне на хайвер да предизвика чифтосване и хвърляне на хайвер по необичайно време. Ако в дадена ситуация се изисква по-късно въвеждане на ваната за хвърляне на хайвер, това следва да бъде направено поне 9 часа след началото на периода на осветление. През тази късна част от деня вече не се предизвиква хвърляне на хайвер.

▼ **M6***Допълнение 4Б***Субстрат за хвърляне на хайвер за *Pimephales promelas***

Две или три комбинирани пластмасови/керамични/от неръждаема стомана къщички с форма на керемидата и вани за хвърляне на хайвер се поставят във всяка камера за изпитване (напр. сив полукръгъл улук с дължина 80 mm, поставен върху ваната с дължина 130 mm, с опорен издатък) (вж. изображението). За аклиматизирани по подходящ начин керемиди от поливинилхлорид или керамичен материал е доказано, че са подходящи като субстрат за хвърляне на хайвер (Thorpe et al., 2007).

Препоръчително е керемидите да са шлайфани за подобряване на прилепването. Ваната също така следва да бъде преградена, за да се предотврати достъпът на рибите до падналите хайверни зърна, освен ако ефикасността на прилепването на хайверните зърна не е доказана за използвания субстрат за хвърляне на хайвер.



Основата е проектирана да побира всички хайверни зърна, които не са прилепнали към повърхността на керемидата, и следователно биха паднали на дъното на контейнера (или хайверни зърна, положени на право върху плоската пластмасова основа). Преди употреба всички субстрати за хвърляне на хайвер трябва да се промият в продължение на минимум 12 часа във вода за разреждане.

ПОЗОВАВАНИЯ

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

▼ M6

Допълнение 5А

Оценка на вторични полови белези у *Pimephales promelas* за откриване на определени химикали с активно действие върху ендокринната система**Общ преглед**

При изпитвания за нарушители на функциите на ендокринната система потенциално важните характеристики на външния вид на полово зрели *Pimephales promelas* включват цвят на тялото (т.е. светло/тъмно оцветяване), начини на оцветяване (т.е. наличието или отсъствието на вертикални ленти), форма на тялото (т.е., форма на главата и гръдната област, разширяване на коремната кухина), както и специализирани вторични полови белези (т.е., брой и размер на размножителните туберкули, размери на дорзалните отлагания на колаген и яйцеполагалото).

Размножителните туберкули са разположени върху главата (дорзалните отлагания) на репродуктивно активните мъжки *Pimephales promelas* и обикновено са подредени двустранно симетрично (Jensen et al. 2001). При контролните женски и ювенилните животни от мъжки и женски пол не се наблюдава развитие на туберкули (Jensen et al. 2001). Възможни са до осем отделни туберкули около очите и между ноздрите на мъжките екземпляри. Най-голям брой и най-големи туберкули са разположени в два успоредни реда, непосредствено под ноздрите и над устата. При много риби съществуват групи от туберкули под долната челюст; тези, които са най-близо до устата, обикновено са един чифт, докато разположените вентрално от тях могат да се състоят от до четири туберкули. Действителният брой на туберкулите рядко е повече от 30 (обхват от 18—28; Jensen et al. 2001). Преобладаващите туберкули (по отношение на броя) представляват единични, относително заоблени структури, с височина приблизително равна на радиуса. Повечето репродуктивно активни мъжки животни също имат поне няколко туберкули, които са разширени и подчертано развити по такъв начин, че не могат да бъдат разграничени като отделни структури.

Някои типове химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система, могат да причинят необичайната поява на някои вторични полови белези в другия пол; например на агонисти на андрогенните рецептори, като 17 β -метилтестостерон или 17 β -тренболон, могат да предизвикат развитие на размножителни туберкули у женски *Pimephales promelas* (Smith 1974; Ankley et al. 2001; 2003), докато агонисти на естрогенните рецептори могат да предизвикат намаляване на размножителните туберкули у мъжки индивиди (Miles-Richardson et al. 1999; Harries et al. 2000).

По-долу е представено описание на характеризирането на размножителни туберкули у *Pimephales promelas* въз основа на процедурите, използвани в лабораторията на Американската агенция за защита на околната среда в Duluth, MN. Специфичните продукти и/или оборудване може да бъдат заменени с налични равностойни материали.

Наблюдението се извършва най-добре с помощта на увеличително стъкло с осветително тяло или със стереомикроскоп с осветително тяло и увеличение 3X. Рибата се наблюдава дорзално с предната част в посока напред (глава към наблюдателя).

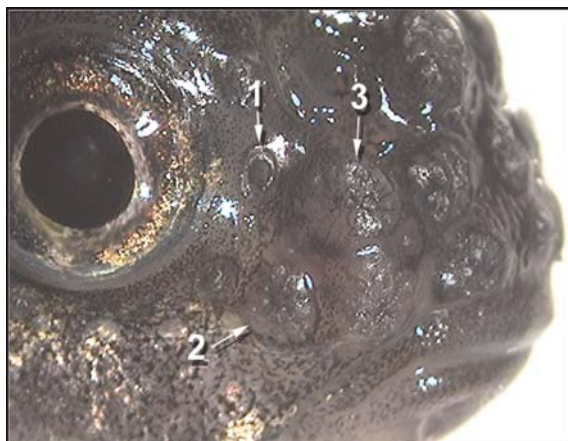
- а) Рибата се поставя в малко блюдо на Петри (напр. 100 mm в диаметър), с предната част в посока напред, с коремния дял надолу. Визьорът се фокусира, за да се даде възможност за идентифициране на туберкулите. Рибата се обръща леко и бавно от една страна на друга, за да се идентифицират областите с туберкули. Туберкулите се преброяват и ранжират.
- б) Наблюдението се повтаря по отношение на предната част на коремния дял, чрез поставяне на рибата дорзално с предната част в посока напред в блюдото на Петри.
- в) Наблюденията трябва да бъдат извършени в рамките на 2 минути за всяка риба.

▼ **M6****Броеве и ранжиране на туберкулите**

Определени шест конкретни области за оценка на наличието и развитието на туберкули в половно зрели *Pimephales promelas*. Разработен е образец за отбелязване на местоположението и количеството на налични туберкули (вж. в края на настоящото допълнение). Броят на туберкулите се записва и техните размери могат да бъдат количествено ранжирани като: 0- липсва, 1-наличен, 2-уголемен и 3-подчертано развит (фиг. 1).

Ранг 0 — липса на туберкули. Ранг 1 — наличен се определя за всеки туберкул, който има точка, чиято височина е почти равна на радиуса му (диаметъра). Ранг 2 — уголемен се определя при тъкан с външен вид, наподобяващ звездичка, обикновено с голяма радиална база с вдлъбнатини или бразди, излизащи от центъра. Височината на туберкула често е по-неравна, но понякога може до известна степен да е закръглена. Ранг 3 — подчертано развит обикновено е доста голям и закръглен, с по-неопределена структура. Понякога тези туберкули са разположени заедно, образувайки обща маса по протежение на отделна област или съчетание от области (B, C и D, описани по-долу). Оцветяването и формата са сходни с ранг 2, но понякога са твърде произволни. Използването на тази рангова система най-общо води като цяло резултати от ранжирането < 50 в нормален контролен мъжки индивид, притежаващ 18 до 20 броя туберкули (Jensen et al. 2001).

Фигура 1



Действителният брой на туберкулите при някои риби може да е по-голям от полетата в образца (допълнение А) за определена област. В такъв случай вътре могат да бъдат отбелязани допълнителни числа, вдясно или вляво от полето. Следователно не е необходимо образецът да показва симетрия. Допълнителен метод за отбелязване на местоположението на туберкули, които са чифтни или съединени вертикално по протежение на хоризонталната равнина на устата, може да се осъществи чрез двойно отбелязване на два ранга на туберкули в едно поле.

Области за отбелязване на местоположението:

A — туберкули, разположени около окото. Положението се отбелязва дорзално към вентрално около предния край на окото. Обичайно са много при половно зрели мъжки от контроли, не са налични при женски, като цяло чифтни (един в близост до всяко око) или единични при женски животни, експонирани на андрогени.

B — туберкули, разположени между ноздрите (сензорни канали). Обикновено чифтни при мъжките в контролите с по-висок ранг за развитие (2-уголемен или 3- подчертано развит). Не са налични при женски от контролите, с известно срещане и развитие при женски животни, експонирани на андрогени.

C — туберкули, разположени непосредствено задно от ноздрите, успоредно на устата. Обикновено уголемени или подчертано развити при половно зрели мъжки от контроли. C ранг налични или уголемени при по-слабо развитите мъжки или при женски животни, експонирани на андрогени.

▼ **M6**

D — туберкули, разположени успоредно по линията на устата. Като цяло се класифицират като развити в контролните животни от мъжки пол. С ранг липсващи в контролните животни от женски пол, но с ранг налични при женски животни, експонирани на андрогени.

E — туберкули, разположени по долната челюст, близо до устата, обикновено малки и обичайно чифтни. Варират при контролните или третираните мъжки, и третирани женски индивиди.

F — туберкули, разположени вентрално от E. Обикновено малки и чифтни. Налични в контролните животни от мъжки пол и при женски животни, експонирани на андрогени.

ПОЗОВАВАНИЯ

- (1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.
- (2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- (3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.
- (4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.
- (5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.
- (6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47:129-145.
- (7) Smith RJF. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52:1031-1038.

Образец за туберкули

Ранжиране с числови стойности на ранга

ID _____

1-наличен

Дата _____

2-уголемен

Общ резултат развит _____

3-подчертано

	A	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	B	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	C	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
	D	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1

	E	X1	X1	
	F	X1	X1	X1

▼ **M6***Допълнение 5Б***Оценка на вторични полови белези у японската оризия за откриване на определени химикали с активно действие върху ендокринната система**

По-долу е представено описание на измерването на папиларните израстъци (*), които са вторични полови белези при японската оризия (*Oryzias latipes*).

- (*) Папиларните израстъци обикновено се появяват само при полово зрели мъжки и се намират на лъчите на перките, като се започне от втория, до седмия или осмия от задния край на аналната перка (фиг. 1 и 2). Независимо от това, израстъци рядко се появяват на първия лъч от задния край на аналната перка. Тази стандартна оперативна процедура (СОП) обхваща измерването на израстъците на първия лъч на перка (в настоящата СОП номерът на лъча на перка се отнася за поредния номер, считано от първия лъч в задния край на аналната перка).
- 1) След изрязване на черния дроб (допълнение 6), трупът се поставя в конична епруветка, съдържаща около 10 ml 10 % неутрален буферизиран формалин (горна страна: глава, долна страна: опашка). Ако гонадата е фиксирана в разтвор, различен от 10 % неутрален буферизиран формалин, прави се напречен разрез през трупа между предната област на аналната перка и ануса, с използване на бръснач, като се внимава да не се увреди половият отвор и самата гонада (фиг. 3). Краниалната част от тялото на рибата се поставя в разтвора на фиксатора за запазване на гонадата, а опашната част от тялото на рибата се поставя в 10 % неутрален буферизиран формалин, както е описано по-горе.
 - 2) След поставянето на тялото на рибата в 10 % неутрален буферизиран формалин задният край на аналната перка се захваща с пинцети и се разтваря за около 30 секунди, за да се запази аналната перка отворена. При захващането на аналната перка с пинцети се захващат няколко лъча на перката в предната област, като се внимава да не се надраскат папиларните израстъци.
 - 3) След държането на аналната перка отворена в продължение на около 30 секунди, тялото на рибата се съхранява в 10 % неутрален буферизиран формалин при стайна температура до измерването на папиларните израстъци (измерването следва да се проведе след фиксиране в продължение най-малко на 24 часа).

Измерване

- 1) След фиксиране на тялото на рибата в 10 % неутрален буферизиран формалин в продължение най-малко на 24 часа, трупът на рибата се взема от коничната епруветка и формалинът се избърсва върху филтърна хартия (или хартиена кърпа).
- 2) Рибата се поставя с корема нагоре. След това аналната перка се изрязва внимателно с малки ножици за дисекция (за предпочитане е да се изреже аналната перка с малко количество птеригофор).
- 3) С пинцети се захваща предната област от отрязаната анална перка и тя се поставя върху предметно стъкло с няколко капки вода. След това аналната перка се покрива с покривно стъкло. При захващането на аналната перка с пинцети се внимава да не се надраскат папиларните израстъци.
- 4) Отчита се броят членчета с папиларни израстъци, като се използва брояч под биологичен микроскоп (изправен или инвертен микроскоп). Папиларните израстъци се познават, когато в задната част на членчетата се вижда малко образуване от израстъци. В работната таблица се записва броят на членчетата с папиларни израстъци във

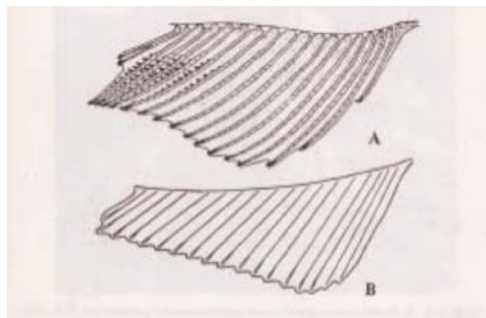
▼ M6

всеки лъч на перка (напр. първи лъч на перка: 0, втори лъч на перка: 10, трети лъч на перка: 12 и т.н.) и се вписва сумата им в таблицата в Excel за всеки отделен екземпляр. Ако е необходимо, аналната перка се фотографира и върху снимката се отчита броят на членчетата с папиларни израстъци.

- 5) След измерването аналната перка се поставя в коничната епруветка, описана в 1) и се съхранява.

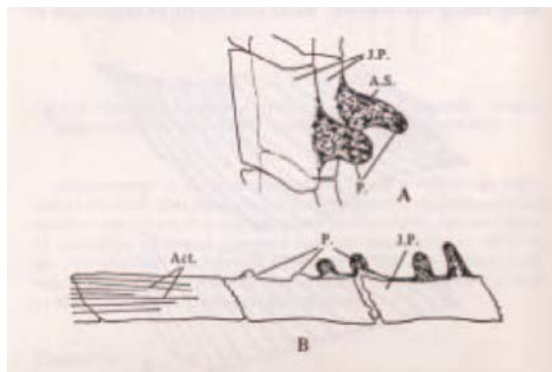
Фиг. 1.

Схема, показваща разликата при половете по отношение на формата и размера на аналната перка. А, мъжка; В, женска. Ока, Т. В., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



Фиг. 2.

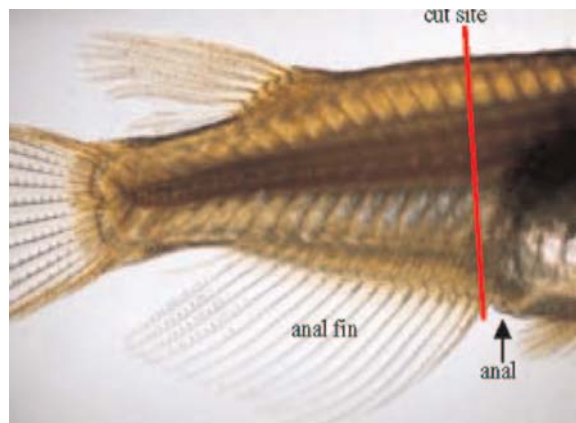
А, папиларни израстъци върху членчета от лъч на анална перка. J.P., членче; A.S., аксиално пространство; P., израстък. В, дистален край на лъч на перка. Дистално в края на лъча са разположени колагенни фибри (Actinotrichia) (Act.). Ока, Т. В., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



▼ M6

Фиг. 3.

Снимка на тяло на риба, показваща мястото на срязване, когато гонадата се фиксира в разтвор на фиксатор, различен от 10 % неутрален буфериран формалин. В този случай останалата част от тялото се разрязва между предната област на аналната перка и ануса с помощта на бръснач (червена лента), и предната част от тялото на рибата се поставя в разтвора на фиксатор за гонади, а опашната част от тялото на рибата се поставя в 10 % неутрален буфериран формалин.



▼ **M6***Допълнение 6***Препоръчителни процедури за пробовземане за анализ на вителогенин**

Трябва да се вземат мерки за избягване на кръстосано замърсяване между пробите с VTG от мъжки и от женски животни.

Процедура 1А: Вземане на кръвна проба от опашна вена/артерия от *Pimephales promelas*

След подлагане на анестезия, опашното стъбло частично се отрязва със скалпел и се взема кръв от опашната вена/артерия с хепаринизирана микрокапилярка за хематокрит. След вземането на кръвната проба плазмата бързо се отделя чрез центрофугиране при 15 000 g за 3 минути (или алтернативно при 15 000 g за 10 минути при 4 °C). По избор, процентът хематокрит може да се определи след центрофугирането. Частта плазма се отстранява от микрокапилярката за хематокрит и се съхранява в центрофужна епруветка с 0,13 единици аprotинин (протеазен инхибитор) при – 80 °C докато може да бъде извършено определяне на вителогенин. В зависимост от размера на *Pimephales promelas* (който зависи от пола) събираемият обем плазма обикновено се намира в интервала от 5 до 60 микролитра на риба (Jensen *et al.* 2001).

Процедура 1Б: Вземане на кръвна проба от сърце от *Pimephales promelas*

Като алтернатива, кръвна проба може също така да се вземе чрез сърдечна пункция с помощта на хепаризирана спринцовка (1 000 единици хепарин/ml). Кръвта се прехвърля в епендорфови епруветки (държани върху лед) и се центрофугира (5 минути, 7 000 g, стайна температура). Плазмата следва да се прехвърли в чисти епендорфови епруветки (в аликвотни части, ако обемът на плазмата позволява това) и бързо да се замрази при температура – 80 °C до нейното анализиране (Panter *et al.*, 1998).

Процедура 2А: Изрязване на черен дроб от японска оризия

Отстраняване на изпитваната риба от камерата за изпитване

- (1) Изпитваната риба следва да се отстрани от изпитвателната камера с помощта на малко кепче. Следва да се внимава изпитваната риба да не попадне в други камери за изпитване.
- (2) По принцип изпитваните риби следва да бъдат отстранявани в следния ред: контрола, контрола на разтворител (където е приложимо), най-ниска концентрация, средна концентрация, най-висока концентрация и положителна контрола. В допълнение, всички мъжки животни следва да бъдат отстранени от дадена камера за изпитване преди да бъдат отстранени оставащите женски.
- (3) Полът на всяка изпитвана риба се определя въз основа на външни вторични полови белези (напр. формата на ананалната перка).
- (4) Опитната риба се поставя в контейнер за пренасяне и се пренася до работното място за изрязване на черния дроб. За точност и за потвърждаване, че броят на рибите, които са отстранени от камерата за изпитване и броят на рибите, останали в камерата за изпитване, са в съответствие с очакванията, се проверяват етикетите на камерата за изпитване и на контейнера за пренасяне.
- (5) Ако полът не може да бъде определен по външния вид на рибата, от камерата за изпитване се отстраняват всички риби. В този случай полът следва да бъде определен чрез наблюдение на гонадата или на вторични полови белези под стереомикроскоп.

▼ M6

Изрязване на черния дроб

- (1) Изпитваните риби се прехвърлят от контейнера за пренасяне в разтвор за подлагане на анестезия с помощта на малкото кепче.
- (2) След анестезирането изпитваните риби се прехвърлят върху филтърната хартия (или хартиена кърпа) с пинсети (разпространени в търговската мрежа). При захващането на изпитваните риби пинцетите се прилагат от страни на главата, за да се предотврати счупването на опашката.
- (3) Водата се избърсва от повърхността на изпитваните риби върху филтърната хартия (или хартиената кърпа).
- (4) Рибата се поставя с корема нагоре. След това се прави малък напречен разрез между областта на врата вентрално и областта в средата на корема с помощта на ножици за дисекция.
- (5) Ножиците за дисекция се вкарват в малката инцизия и се разрязва коремът от определена точка каудално от бранхиалната мантия до краниално от ануса по средната линия на корема. Внимава се ножиците за дисекция да не се вкарват прекомерно дълбоко, за да се избегне увреждане на черния дроб и гонадата.
- (6) Под стереомикроскоп се извършват следните операции.
- (7) Изпитваната риба се поставя с корема нагоре върху хартиената кърпа (стъклено блюдо на Петри или предметно стъкло също така са на разположение).
- (8) Стените на коремната кухина се разширяват с прецизни пинсети и вътрешните органи се екстериоризират. Също така, приемливо е екстериоризирането на външните органи да се извърши чрез отстраняване на едната страна от стената на коремната кухина, ако е необходимо.
- (9) С помощта на друг чифт прецизни пинцети се разкрива свързаната част на черния дроб и жлъчния мехур. След това се захваща жлъчният канал и се прекъсва жлъчният мехур. Внимава се да не се пробие жлъчният мехур.
- (10) Захваща се хранопроводът и по същия начин стомашно-чревният тракт се изрязва от черния дроб. Внимава се да не се допусне изтичане на съдържанието на стомашно-чревния тракт. Стомашно-чревният тракт се изрязва каудално от ануса и се отстранява от коремната кухина.
- (11) Отстранява се масата от мазнини и други тъкани от периферията на черния дроб. Внимава се да не се надраска черният дроб.
- (12) С помощта на прецизните пинцети се захваща областта на вратата на черния дроб и черният дроб се отстранява от коремната кухина.
- (13) Черният дроб се поставя върху предметното стъкло. С помощта на прецизните пинцети от повърхността на черния дроб се отстраняват всякакви допълнителни мазнини и чужди тъкани (напр. перитонеумът), ако е необходимо.
- (14) Теглото на черния дроб се измерва като тара с 1,5 ml микропруветка, с помощта на електронна аналитична везна. Стойността се вписва в работния лист (точност: 0,1 mg). Потвърждава се информацията за идентифициране, намираща се върху етикета на микропруветката.
- (15) Капачката на микропруветката, съдържаща черния дроб, се затваря. Тя се съхранява в охладителен статив (или охладителен статив с лед).
- (16) След изрязването на всеки черен дроб инструментите за дисекцията се почистват или се заменят с чисти.

▼ **M6**

- (17) Отстранява се черният дроб от всички риби, намиращи се в контейнера за пренасяне, както е описано по-горе.
- (18) След като черен дроб е изрязан от всички риби в контейнера за пренасяне (т.е. от всички мъжки или женски в дадена изпитвателна камера) всички екземпляри от черен дроб се поставят на статив за епруветки с етикет за идентификация и слагат за съхранение във фризер. Когато черният дроб се дава за предварителна обработка непосредствено след изрязването, екземплярите се пренасят до следващото работно място в охладителен статив (или охладителен статив с лед).

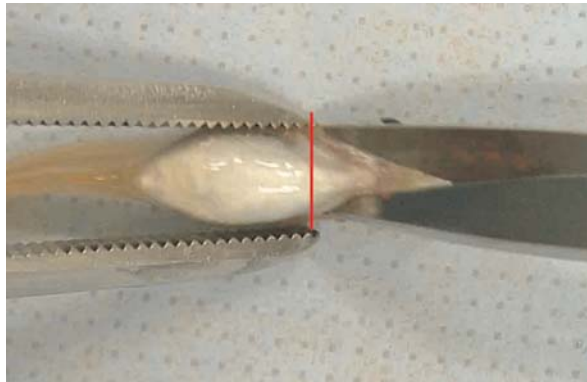
След изрязването на черния дроб трупът на рибата е на разположение за измерване на вторични полови белези.

Екземпляри

Ако не се използват за предварителна обработка непосредствено след изрязването, екземплярите от черен дроб, взети от изпитваните риби, се съхраняват при ≤ -70 °C.

Фиг-1

Прави се разрез с ножици точно пред гърдните перки.



Фиг-2

Средната линия на корема се разрязва с ножица до точка, разположена приблизително 2 mm краниално от ануса.



▼ M6

Фиг-3

Коремните стени се разтварят с пинцети за разкриване на черния дроб и други вътрешни органи. (като алтернатива, коремните стени могат да се забодат латерално).



Фиг-4

С помощта на пинцети се прави дисекция на черния дроб и същият се изрязва.



Фиг-5

Червата леко се издърпват с помощта на пинцети.



▼ **M6**

Фиг-6

Двата края на червата и мезентериалните връзки се отрязват с ножици.



Фиг-7 (женски)

Процедурата е идентична като тази при мъжките.



Фиг-8

Завършената процедура.



Процедура 2Б: Японска оризия (*Oryzias latipes*), предварителна обработка на черен дроб за анализ на вителогенин

взема се бутилката с буфера за хомогенат от комплекта за ELISA и се охлажда с натрошен лед (температура на разтвора: ≤ 4 °C). Ако се използва буфер за хомогенат от EnBio система за ELISA система се използва, разтворът се размразява при стайна температура и след това бутилката се охлажда с натрошен лед.

▼ M6

Изчислява се обемът на буфера за хомогенат за черния дроб въз основа на теглото му (добавят се 50 µl буфер за хомогенат на mg тегло на черен дроб за хомогенат). Например, ако теглото на черния дроб е 4,5 mg, обемът на буфера за хомогенат за черния дроб е 225 µl. Изготвя се списък с обемите на буфера за хомогенат за всички екземпляри черен дроб.

Подготовка на черния дроб за предварителната обработка

- (1) Непосредствено преди предварителната обработка микропруветката от 1,5 ml, съдържаща черния дроб, се взема от фризера.
- (2) Предварителна обработка на черния дроб от животни от мъжки пол следва да се извършва преди тази при женските животни, за да се предотврати замърсяване с вителогенин. Освен това, предварителната обработка за изпитваните риби следва да се извършва в следния ред: контрола, контрола на разтворител (където е приложимо), най-ниска концентрация, средна концентрация, най-висока концентрация и положителна контрола.
- (3) Броят на взетите от фризера в даден момент микропруветки от 1,5 ml, съдържащи проби черен дроб, не следва да надвишава броя, който може да се центрофугира по това време.
- (4) Микропруветките от 1,5 ml, съдържащи проби черен дроб, се подреждат на охладителния статив с лед по реда на екземпляра (няма нужда от размразяване на черния дроб).

Извършване на предварителната обработка

1. Добавяне на буфера за хомогенизиране

- (1) Проверява се списъкът за обема на буфера за хомогенат, който да се използва за определена проба черен дроб и микропипетата се настройва (диапазон на обемите: 100-1 000 µl) към подходящия обем. Поставя се чист връх на микропипетата.
- (2) Буферът за хомогенат се взема от бутилката с реактива и се добавя в микропруветката от 1,5 ml, съдържаща проба черен дроб.
- (3) Буферът за хомогенат се добавя във всички микропруветки от 1,5 ml, съдържащи проба черен дроб, в съответствие с гореописаната процедура. Не е необходимо да се сменя върхът на микропипетата с нов. Независимо от това, ако върхът е замърсен или се предполага, че е замърсен, той следва да бъде сменен.

2. Хомогенизиране на черния дроб

- (1) Поставя се нов пестик за хомогенизиране в хомогенизатора за микропруветката.
- (2) Пестикът се въвежда в микропруветката от 1,5 ml. Хомогенизаторът се държи за натиск върху черния дроб между повърхността на пестика и вътрешната стена на микропруветката от 1,5 ml.
- (3) Хомогенизаторът за микропруветката се оставя да функционира в продължение на 10 до 20 секунди. Микропруветката от 1,5 ml се охлажда с натрошен лед по време на функционирането.
- (4) Пестикът се изважда от микропруветката от 1,5 ml и се оставя в покой в продължение на около 10 секунди. След това се извършва визуална проверка на състоянието на суспензията.
- (5) Ако в суспензията се наблюдават парченца от черен дроб, операции 3) и 4) се повтарят, за да се приготви задоволителен хомогенат.

▼ M6

- (6) Суспендираният хомогенат от черен дроб се охлажда на охладителен статив с лед до центрофугирането.
 - (7) Пестикът се сменя с нов за всеки хомогенат.
 - (8) Всички екземпляри от черен дроб се хомогенизират с буфер за хомогенат в съответствие с гореописаната процедура.
3. Центрофугиране на суспендирания хомогенат от черен дроб
- (1) Потвърждава се температурата на охладителната центрофуга на ≤ 5 °C.
 - (2) Микроепруветките от 1,5 ml, съдържащи суспендирания хомогенат от черен дроб, се поставят в охладената центрофуга (коригира се балансът, ако е необходимо).
 - (3) Суспендираният хомогенат от черен дроб се центрофугира при 13 000 g за 10 минути при ≤ 5 °C. Ако супернатантът е разделен по подходящ начин обаче, центробежната сила и времето могат да бъдат коригирани според необходимостта.
 - (4) След центрофугирането се проверява дали супернатантът е разделен по подходящ начин (повърхностен слой: липиди, среден слой: супернатант, дънен слой: чернодробна тъкан). Ако разделянето не е достатъчно, суспензията се центрофугира отново при същите условия.
 - (5) Всички екземпляри се отстраняват от охладената центрофуга и се подреждат на охладителния статив с лед по реда на екземпляра. Внимава се да не се суспендира повторно някой от разделените след центрофугирането слоеве.
4. Вземане на супернатанта
- (1) На статива за епруветки се поставят четири микроепруветки от 0,5 ml за съхранение на супернатанта.
 - (2) От всеки супернатант (разделен като междинен слой) с микропипетата се вземат по 30 μ l и се поставят в една микроепруветка от 0,5 ml. Внимава се да не се вземе от липидите върху повърхността, или от дънния слой с чернодробната тъкан.
 - (3) Супернатантът се взема и се поставя в други микроепруветки от 0,5 ml по същия начин, както е описано по-горе.
 - (4) Останалата част от супернатанта се взема с микропипетата (ако е осъществимо: ≥ 100 μ l). След това супернатантът се поставя в оставащата микроепруветка от 0,5 ml. Внимава се да не се вземе от липидите върху повърхността, или от дънния слой с чернодробната тъкан.
 - (5) Капачката на микроепруветката от 0,5 ml се затваря и върху етикета се отбелязва обемът на супернатанта. След това микроепруветките се охлаждадат незабавно върху охладителния статив с лед.
 - (6) Върхът на пипетата се сменя с нов за всеки супернатант. Ако към върха остава прикрепено голямо количество липиди, той се сменя незабавно с нов, за да се избегне замърсяване на екстракта от черен дроб с мазнини.
 - (7) Цялото количество центрофугиран супернатант се поставя в четири микроепруветки от 0,5 ml съгласно процедурата, описана по-горе.

▼ **M6**

- (8) След поставянето на супернатантата в микроепруветките от 0,5 ml, всички те се поставят на статива за епруветки с етикет за идентификация, след което се замразяват незабавно във фризера. Ако концентрациите на VTG се измерват непосредствено след предварителната обработка, една микроепруветка от 0,5 ml (съдържаща 30 µl супернатант) се съхранява на хладно на статива за епруветки и се прехвърля на работното място, където се провежда изпитването с ELISA. В такъв случай оставащите микроепруветки се поставят на стативите за епруветки и се замразяват във фризера.
- (9) След вземането на супернатанта остатъкът се изхвърля по подходящ начин.

Съхранение на пробите

Микроепруветките от 0,5 ml, съдържащи супернатанта от хомогената от черен дроб, се съхраняват при ≤ -70 °C до използването им за ELISA.

Процедура 3А: Вземане на кръвна проба от опашна вена/артерия от зеброво данио

Непосредствено след анестезията опашното стъбло се разрязва напречно и кръвта се отстранява от опашната артерия/вена с хепаринизирана микрокапилярка за хематокрит. Обемът на кръвта варира от 5 до 15 µl в зависимост от размера на рибата. Равен обем буфер с аprotинин (6 µg/ml в PBS) се добавя към микрокапилярката и плазмата се разделя от кръвта чрез центрофугиране (5 минути при 600 g). Плазмата се събира в епруветките за изпитването и се съхранява при температура – 20 °C до анализа за вителогенин или за други представляващи интерес белтъци.

Процедура 3Б: Кръвна проба чрез сърдечна пункция при зеброво данио

За да се избегне съсирването на кръвта и разграждането на белтъците, пробите се вземат във фосфатно буферизиран физиологичен разтвор (PBS), съдържащ хепарин (1 000 единици/ml) и протеазен инхибитор аprotинин (2 TBU/ml). Като съставки за буфера са препоръчителни хепарин (амониева сол) и лиофилизиран аprotинин. За вземане на кръв се препоръчва спринцовка (1 ml) с фиксирана тънка игла (напр. Braun Omnican-F). Спринцовката трябва да се запълни с буфер (около 100 µl) за пълно елуиране на малките обеми кръв от всяка риба. Кръвните проби се вземат чрез сърдечна пункция. Първоначално рибата трябва да бъде анестезирана с MS-222 (100 mg/l). Правилното извършване на анестезията позволява на ползвателя да различава пулсирането на сърцето на зебровото данио. При извършването на сърдечната пункция буталото на спринцовката се държи под слаб натиск. Обемът на кръвната проба, който може да бъде взет, варира между 20 и 40 микролитра. След сърдечната пункция сместа от кръвта и буфера следва да бъде поставена в епруветката за изпитване. Плазмата се отделя от кръвта чрез центрофугиране (20 мин.; 5 000 g) и следва да се съхранява при – 80 °C докато стане необходима за анализ.

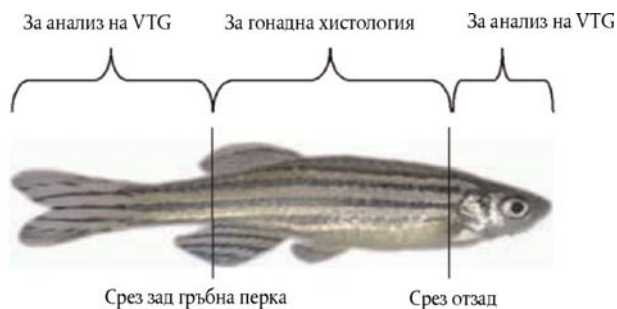
Процедура 3В: СОП: Зеброво данио, хомогенизиране на главата и опашката

- (1) Рибите се подлагат на анестезия и евтаназия в съответствие с описанието на изпитването.
- (2) Главата и опашката се изрязват от рибата в съответствие с фигура 1.

Важно: Всички инструменти за дисекция и плоскостта за разрязване трябва да се промият и почистят по подходящ начин (например с 96 % етанол) между обработването на всяка отделна риба, за да се предотврати „замърсяване с вителогенин“ от женски или индуцирани мъжки към неиндуцирани мъжки.

▼ **M6**

Фигура 1



- (3) Теглото на обединените глава и опашка от всяка риба се измерва с точност до един mg.
- (4) След като се претеглят, частите се поставят в подходящи епруветки (напр. 1,5 ml епендорфова епруветка) и се замразяват при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до хомогенизирането, или направо се хомогенизират върху лед с два пластмасови пестика. (Могат да се използват други методи, ако те се извършват върху лед и резултатът е хомогенна маса). Важно: Епруветките следва да бъдат номерирани по подходящ начин, така че главата и опашката от рибата да могат да бъдат свързани с частта от тялото, останала след изрязването им и използвана за хистология на гонадите.
- (5) Когато се достигне до хомогенна маса, се добавя леденостуден буфер за хомогенизиране (*) в количество, равно на 4 пъти теглото на тъканта. Продължава се работата с пестичите, докато сместа стане хомогенна. Важна забележка: За всяка риба се използват нови пестичи.
- (6) Пробите се поставят върху лед до центрофугирането при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ на $50\,000 \times g$ за 30 min.
- (7) Използва се пипета за поставяне на порции от 20 μl супернатант в поне две епруветки, чрез потапяне на върха на пипетата под слоя мазнини на повърхността, и внимателно изсмукване на супернатанта, без фракции от мазнини или пелети.
- (8) Епруветките се съхраняват при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до момента на употребата.

(*) **Буфер за хомогенизиране:**

- (50 mM TRIS хидрохлорид pH 7,4; 1 % смес от инхибитори на протеаза (Sigma): 12 ml TRIS хидрохлорид pH 7,4 + 120 μl смес от инхибитори на протеаза.
- TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) напр. от Bie & Berntsen, Дания.
- Смес от инхибитори на протеаза: От Sigma (за тъкани от бозайници) Продуктов номер P 8340.
- *Бележка:* Буферът за хомогенизирането следва да се използва на същия ден, в който е приготвен. По време на употреба се поставя върху лед.

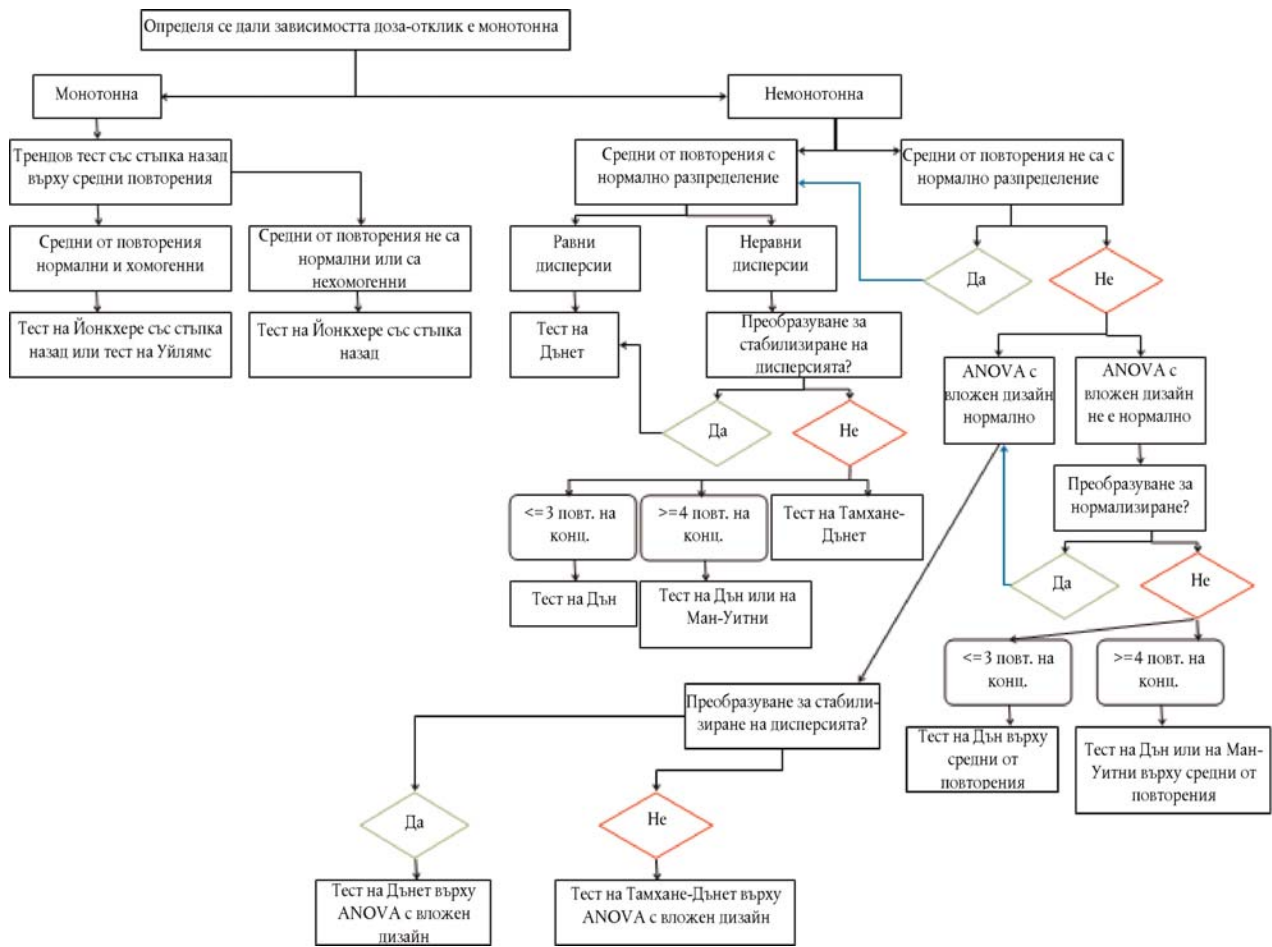
▼ M6*Допълнение 7***Проби с внесена добавка вителогенин и еталон, който е референтен между различни изследвания**

Всеки ден, в който се извършват изпитвания за VTG, се анализира проба с внесена добавка с използване на еталон, който е референтен между различни изследвания. Вителогенинът, използван за получаването на еталон, който е референтен между различни изследвания, ще е от партида, различна от използваната за приготвяне на еталони за калибриране за извършваното изследване.

Пробата с внесена добавка се приготвя чрез добавяне на предварително известно количество от еталона, който е референтен между различни изследвания, в проба от плазма от контролен мъжки екземпляр. В пробата се внася добавка с цел постигане на концентрация на вителогенин между 10 и 100 пъти по-висока от очакваната концентрация на вителогенин в контролен мъжки екземпляр. Пробата от плазма от контролен мъжки екземпляр, в която се внася добавка, може да бъде от отделна риба, или може да бъде съставена от няколко риби.

Подпроба от плазма от контролен мъжки екземпляр, в която не е внесена добавка, се анализира най-малко в две гнезда с повторения. Пробата с внесена добавка също се анализира най-малко в две гнезда с повторения. Средното количество вителогенин в двете проби от плазма от контролен мъжки екземпляр, в които не е внесена добавка, се добавя към изчисленото количество вителогенин, внесено като добавка в пробите, за да се определи очаквана концентрация. Отношението на тази очаквана концентрация към измерената концентрация се протоколира заедно с резултатите от всеки набор от изследвания от този ден.

Блокова схема за статистическия анализ



▼ **M6****В.38. ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА МЕТАМОРФОЗА НА ЗЕМНОВОДНИ**

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (ТГ) 231 (2009). Необходимостта от разработване и валидиране на изследване, позволяващо откриване на химикали, активни в системата на щитовидната жлеза на гръбначни животни, произлиза от загрижеността, че нивата на химикали в околната среда могат да причинят неблагоприятни въздействия както за хората, така и за дивата флора и фауна. През 1998 г. ОИСП стартира с висок приоритет дейност по преразглеждане на съществуващите Насоки за изпитване и по разработване на нови Насоки за изпитване за скрининг и изпитвания за потенциални нарушители на функциите на ендокринната система (8). Един от елементите на дейността бе да се разработи насока за изпитване за скрининг на химикали, активни в системата на щитовидната жлеза на гръбначни животни. Бяха предложени както подобряване на „28-дневно изследване на оралната токсичност при гризачи с повтаряща се доза“ (глава Б.7 от настоящото приложение), така и изследване за метаморфоза на земноводни (ИМЗ). Подобреният метод за изпитване Б.7 премина през валидиране и беше издаден преработен метод за изпитване. Изследването за метаморфоза на земноводни (ИМЗ) премина през обширна програма за валидиране, които включваше вътрешно- и междулабораторни изследвания, които доказват уместността и надеждността на изследването (1, 2). Впоследствие, валидирането на изследването бе подложено на партньорска оценка от група от независими експерти (3). Настоящият метод за изпитване е резултат от опита, придобит по време на изследванията за валидиране за откриване на химикали, активни по отношение на щитовидната жлеза, както и от работата на други места в държавите — членки на ОИСП.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

2. Изследването за метаморфоза на земноводни (ИМЗ) е скринингово изследване, целящо емпирично определяне на химикали, които могат да пречат на нормалното функциониране на хипоталамус-хипофиза-гонадата (ХХГ) ос. ИМЗ представлява обобщен модел за гръбначни, доколкото се основава на съхранените структури и функции на ХХГ ос. Това изследване е важно, тъй като метаморфозата на земноводните предоставя добре проучен тиреоидно зависим процес, който е отклик на химикали, активни в рамките на ХХГ ос, и е единственото съществуващо изследване, което открива тиреоидна активност при животни, преминаващи през морфологично развитие.
3. Общият план за опита включва експониране на попови лъжички от *Xenopus laevis* на етап 51 най-малко на три различни концентрации на изпитван химикал и контрола на вода за разреждане в продължение на 21 дни. В изпитването за всяко третиране се правят по четири повторения. За всички групи за третиране при началото на изпитването гъстотата на ларвите е 20 попови лъжички на съд за изпитване. Наблюдаваните крайни точки са дължина на задни крайници (HLL), дължина от върха на муцуната до клоачния отвор (SVL), етап на развитие, мокро тегло, тиреоидна хистология и ежедневни наблюдения на смъртността.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Животински вид за изпитването

4. *Xenopus laevis* се отглежда обичайно и повсеместно в лабораторни условия и лесно може да бъде доставен от доставчици в търговската мрежа. При този животински вид размножаването може лесно да бъде индуцирано през цялата година с използване на инжекции с човешки хорионен гонадотропин (hCG), като получените ларви могат да бъдат отглеждани по обичаен начин и в големи количества до избрани

▼ M6

стадии на развитие, за да даде възможност за използване на протоколи за изпитване, специфични за съответния стадий. Предпочита се ларвите, използвани за изследването, да са от полово зрели индивиди, отгледани в изпитващата лаборатория. Като алтернатива, въпреки че това не е предпочитаната процедура, на лабораторията, провеждаща изпитването, могат да бъдат доставени яйца и ембриони, като те се оставят да се аклиматизират; доставянето на ларви за използване при изпитването е неприемливо.

Оборудване и материали

5. За провеждането на това изследване са нужни следното оборудване и материали:
- а) система за експозицията (вж. описанието по-долу);
 - б) аквариуми от стъкло или от неръждаема стомана (вж. описанието по-долу);
 - в) съдове за размножаване;
 - г) апарати за контролиране на температурата (напр. от нагреватели или охладители (регулируеми до $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$));
 - д) термометър;
 - е) бинокулярен стереомикроскоп;
 - ж) цифров фотоапарат с разделителна способност най-малко 4 мегапиксела и функция за микрофотография;
 - з) софтуер за дигитализиране на изображения;
 - и) блюдо на Петри (напр. $100 \times 15 \text{ mm.}$) или прозрачна пластмасова камера със сравними размери;
 - й) аналитични везни, с които се измерва до 3-я знак след десетичната запетая (mg).
 - к) устройство за измерване на съдържанието на разтворения кислород;
 - л) рН-метър;
 - м) измервателен уред за интензитет на светлината с възможности за измерване в lux;
 - н) лабораторна стъклария и инструменти;
 - о) регулируеми пипети (от 10 до 5 000 μl) или комплекти пипети с еквивалентни размери;
 - п) изпитван химикал в количество, достатъчно за провеждане на изследването, за предпочитане от една партида;
 - р) Аналитична апаратура, подходяща за химикала за изпитвания химикал, или договорени услуги по анализ.

Изпитваемост на химикала

6. ИМЗ се основава на протокол за експозиция във вода, при който изпитваният химикал се въвежда в камерите за изпитване чрез проточна система. Проточните методи обаче налагат ограничения по отношение на вида на химикалите, които могат да бъдат изпитвани, определени от физичните и химичните свойства на химикала. Следователно, преди да се използва настоящият протокол, следва да бъде получена базова информация за химикала, която е от значение за определяне на изпитваемостта, и следва да бъде консултиран и документиран с насоки за изпитване за токсичност във водна среда на трудни вещества и смеси (4). Характеристиките, които показват, че изпитването на химикала във водни системи може да е трудно,

▼ M6

включват: високи коефициенти на разпределение октанол/вода ($\log K_{ow}$), висока летливост, склонност към хидролиза и склонност към фотолиза при заобикалящите условия на осветеност в лабораторията. Други фактори също могат да бъдат относими за определянето на изпитваемостта и следва да бъдат определяни за всеки отделен случай. Ако за химикала не е възможно успешно изпитване с използване на проточна система, може да се използва статична система с обновяване. Ако нито една от тези системи не е в състояние да бъде адаптирана за изпитвания химикал, тогава по подразбиране той не следва да бъде изпитван по настоящия протокол.

Система на експозиция

7. Системата с проточно разреждащо устройство, когато е възможно нейното използване, се предпочита пред статичната система с обновяване. Ако физическите и/или химическите свойства на някой от изпитваните химикали не позволяват използване на системата с проточно разреждащо устройство, може като алтернатива да се използва друга система (например статична система с обновяване). Компонентите на системата трябва да имат компоненти за контакт с водата, изготвени от стъкло, неръждаема стомана и/или политетрафлуоретилен. Независимо от това, може да бъде използвана подходяща пластмаса, ако не излага на риск изследването. Съдовете за експозицията трябва да са аквариуми от стъкло или неръждаема стомана, оборудвани с вертикални тръби, в резултат на което съдът е с приблизителен обем между 4,0 и 10,0 l и с минимална дълбочина на водата от 10 до 15 cm. Системата следва да бъде в състояние да поддържа всички концентрации на експозиция и контрола, с четири повторения на третиране. Дебитът на потока към всеки съд трябва да бъде постоянен по отношение както на поддържането на биологичните условия, така и на експозицията на химикала (напр. 25 ml/min). Местоположението на съдовете за третирането трябва да бъде определено на случаен принцип в рамките на системата за изпитването, с цел намаляване на потенциалните въздействия на местоположението, включително леките колебания в температурата, светлинния интензитет и др. Следва да се използва флуоресцентно осветление за осигуряване на период на осветеност от 12 часа светлина: 12 часа тъмнина при интензитет от 600 до 2 000 лукса (lumen/m^2) на повърхността на водата. Температурата на водата трябва да се поддържа на $22^\circ \pm 1^\circ \text{C}$, pH се поддържа между 6,5 и 8,5, а концентрацията на разтворения кислород (DO) > 3,5 mg/l (> 40 % от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух) във всеки съд за изпитване. Като минимум температурата на водата, pH и разтвореният кислород трябва да се измерват всяка седмица; за предпочитане е температурата да се измерва непрекъснато поне в един от съдовете за изпитване. В допълнение 1 се описват накратко условията на опита, при които следва да бъде изпълнен протоколът. За допълнителна информация относно проточната система за експозиция, или статичната система с обновяване се използват Ръководството на ASTM за извършване на изпитвания за остра токсичност за материали с риби, макробезгръбначни и земноводни (5), както и общи изследвания за токсичност във водна среда.

Качество на водата

8. Може да се използва всякаква вода, която се предлага на местно равнище (напр. изворна вода или филтрувана с въглен чешмяна вода) и позволява нормален растеж и развитие на поповите лъжички на *X. laevis*. Тъй като качеството на водата на местно равнище може да се различава значително от едно място на друго, следва да се извърши анализ на качеството на водата, по-специално ако няма на разположение данни за предходни периоди относно полезността на водата за отглеждане на *Xenopus*. Следва да се обърне специално внимание водата да не съдържа мед, хлор и хлорамини, всички от които са токсични за жабите и поповите лъжички. Освен това се препоръчва да се анализира водата за фонов нива на флуорид,

▼ **M6**

перхлорат и хлорат (странични продукти от дезинфекцията на водата за пиене), тъй като всички тези аниони са субстрати за транспортирането на йод за щитовидната жлеза и повишени нива на всеки от тези аниони може да доведат до невъзможност за разграничаване на резултатите от изследването. Анализът следва да се извърши преди да започне изпитването и водата за изпитване по принцип трябва да не съдържа тези аниони.

Концентрация на йодид във водата за изпитване

9. За да може щитовидната жлеза да синтезира хормони, на разположение на ларвите трябва да има достатъчно йодид, чрез съчетание от източници на вода и на храна. Понастоящем не съществуват емпирично изведени насоки за минималните концентрации на йодид. Независимо от това наличието на йодид може да засегне способността на тиреоидната система да реагира на средства, активни по отношение на щитовидната жлеза, и за тази наличност е известно, че променя основната дейност на щитовидната жлеза — аспект, който заслужава внимание при интерпретиране на резултатите от тиреоидната хистопатология. Следователно, измерената концентрация на йодид във водата за изпитване следва да бъде протоколирана. Въз основа на наличните данни от проучванията за валидиране е доказано, че протоколът функционира добре, когато концентрацията на йодид (Г) във водата за изпитване е била между 0,5 и 10 µg/l. В идеалния случай минималната концентрация на йодид във водата за изпитване трябва да бъде 0,5 µg/l. Ако водата за изпитване е възстановена от дейонизирана вода, йодът следва да се добави при минимална концентрация от 0,5 µg/l. Всяко допълнително добавяне на вода за изпитване с йод или други соли следва да се отбележи в протокола.

Отглеждане на животни

Грижи за полово зрелите индивиди и за размножаването

10. Грижите за полово зрелите индивиди и за размножаването се полагат в съответствие със стандартните насоки и за по-подробна информация читателят се насочва към стандартното ръководство за изследване на тератогенезата при жабешки ембриони (FETAX) (6). Такива стандартни насоки предоставят пример за подходящи грижи и методи на размножаване, но не се изисква строго спазване. За предизвикване на размножаването двойки (3-5) от полово зрели женски и мъжки индивиди се инжектират с човешки хорионен гонадотропин (hCG). Женски и мъжки екземпляри се инжектират съответно с около 800 IU-1 000 IU и 600 IU-800 IU hCG, разтворен в 0,6-0,9 % физиологичен разтвор. Двойките за размножаване се държат в големи съдове, без външно въздействие и при статични условия, за да се насърчи репродуктивното поведение. На дъното на всеки съд за размножаване следва да има лъжливо дъно от мрежа от неръждаема стомана или пластмаса, което да позволява на яйцата да изпаднат на дъното на съда. Жаби, инжектирани в късния следобед, обикновено полагат повечето от яйцата си до средата на сутринта на следващия ден. След получаването и оплождането на достатъчно количество яйца, полово зрелите индивиди следва да бъдат отстранени от съдовете за размножаване.

Грижи за ларвите и подбор

11. След като полово зрелите индивиди бъдат отстранени от съдовете за размножение, яйцата се събират и се оценяват за жизнеспособност, с използване на представителна извадка от ембриони, взета от всички съдове за размножение. Най-доброто отделно снасяне (или снасяния) на яйца (препоръчват се 2-3 за оценяване на качеството на яйцата) следва да бъде запазено, на база на жизнеспособността на ембрионите и наличието на достатъчен брой ембриони (минимум 1 500). Всички организми, които се използват в изследването, следва да произхождат само от едно снасяне на яйца (т.е. не следва да се смесват снасяния на яйца). Ембрионите се прехвърлят в голямо, плоско блюдо или чиния и всички очевидно мъртви или необичайни яйца (виж определението в (5)) се отстраняват с помощта на пипета или капкомер за очи. Здравите ембриони от всяко от трите снасяния на яйца се прехвърлят в три отделни съда за излюпване. Четири дни след поставянето в

▼ **M6**

съдовете за излюпване най-доброто снасяне на яйца, въз основа на жизнеспособността и успешното излюпване, се избира и ларвите се прехвърлят в подходящ брой съдове за отглеждане при $22^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$. Освен това, някои допълнителни ларви се преместват в допълнителни съдове за употреба за замяна в случай че се появи смъртност в съдовете за отглеждане през първата седмица. Тази процедура поддържа последователна гъстота на организмите и по този начин намалява различията в рамките на кохортата от отделното снасяне на яйца. Всички съдове за отглеждане следва да се източват ежедневно. Като предпазна мярка, виниловите или нитрилните ръкавици са за предпочитане пред латексовите ръкавици. При смъртност през първата седмица, умрелите екземпляри следва да се отстраняват ежедневно и следва да се добавят от приготвените за замяна ларви, за да се поддържа гъстотата на организмите. Храненето следва да е поне два пъти на ден.

12. По време на фазата преди експозицията поповите лъжички се аклиматизират към условията на действителната фаза на експозиция, включително вида на храната, температурата, цикъла светлина-тъмнина и средата за отглеждането. Ето защо се препоръчва по време на фазата преди експозицията и на фазата на експозиция да се използва една и съща вода за отглеждането/разреждането. Ако се използва статична система за отглеждане за поддържането на поповите лъжички по време на фазата преди експозицията, средата за отглеждане следва да се заменя изцяло поне два пъти седмично. Следва да се избягват струпувания, предизвикани от голямата гъстота на ларвите по време на фазата преди експозицията, тъй като такива ефекти могат да засегнат чувствително развитието на поповите лъжички по време на следващата след това фаза на изпитването. Поради това гъстотата на отглеждането не трябва да надвишава приблизително четири попови лъжички на литър среда за отглеждане (статична система на експозиция) или 10 попови лъжички на литър среда за отглеждане (напр. с дебит 50 ml/min във системата преди експозицията или системата за отглеждане). При тези условия поповите лъжички следва да се развият от етапи 45/46 към етап 51 в рамките на дванадесет дни. Поповите лъжички, които са представителни екземпляри за тази изходна популация, следва да бъдат проверявани ежедневно за етапа на развитие, с цел да се определи подходящият момент за започване на експозицията. Следва да се положат грижи за свеждане до минимум на стреса и травмирането на поповите лъжички, особено по време на преместване, почистване на аквариумите и манипулиране на ларвите. Следва да бъдат избягвани стресиращите условия/действия, като например висок и/или непрекъснат шум, почукване по аквариума, вибрации в аквариума, прекомерна активност в лабораторията и резки промени в компонентите на околната среда (наличие на светлина, температура, pH, DO, дебит на водния поток и т.н.). Ако поповите лъжички не се развият до етап 51 в срок от 17 дни след оплождането, за потенциална причина следва да бъде считан прекомерният стрес.

Отглеждане и хранене на ларвите

13. Поповите лъжички биват хранени напр. с достъпните в търговската мрежа храни за попови лъжички, използвани в изследванията за валидиране (вж. също допълнение 1) през целия период преди експозицията (по Nieuwkoop и Faber (NF) етап 45/46 (8)) и през целия период на изпитването от 21 дни, или са на друг хранителен режим, за който е доказано, че дава резултати, еквивалентни на тези в изследването за метаморфоза на земноводни. Хранителният режим през целия период преди експозицията следва внимателно да се регулира така, че да отговаря на нуждите на развиващите се попови лъжички. Това означава, че на новоизлюпените малки попови лъжички следва да бъдат давани малки порции храна няколко пъти на ден (поне два пъти). Следва да се избягва прекомерното количество с цел *i*) да се запази качеството на водата и *ii*) да се предотврати задръстването на хрилните филтри с частици храна и детрит. За храните за попови лъжички, използвани в изследванията за валидиране, дневните хранителни дажби следва да бъдат увеличавани с

▼ **M6**

растежа на поповите лъжички до около 30 mg на индивид на ден малко преди започването на изпитването. При проучванията за валидиране е доказано, че тази достъпна в търговската мрежа храна допринася за нормалния растеж и развитие на поповите лъжички на *X. laevis* и същата представлява фини частици, суспендирани във водния стълб за дълъг период от време и подлежи на отмиване с оттока. Следователно общото дневно количество храна следва да се разделя на по-малки порции и да се дава поне два пъти дневно. Хранителният режим за тази храна е посочен в таблица 1. Скоростите на подаване на храната трябва да бъдат записвани. Тя може да се дава в сухо състояние или като изходен разтвор, приготвен във вода за разреждане. Този изходен разтвор трябва да се приготвя пряко през ден и да се съхранява при температура 4 °C, когато не се използва.

Таблица 1

Режим на хранене с храна за попови лъжички от търговската мрежа, използван в изследванията за валидиране за попови лъжички на *X. laevis* по време на интравиталната част от ИМЗ в проточни условия

Ден от проучването	Хранителната дажба (mg храна на индивид на ден)
0-4	30
5-7	40
8-10	50
11-14	70
15-21	80

Аналитична химия

14. Преди провеждането на проучването следва да бъде оценена стабилността на изпитвания химикал, като се използва съществуващата информация за неговата разтворимост, разграждане и летливост. От разтворите за изпитване от всяко повторение при всяка концентрация следва да бъде взета проба за химични анализи в началото на изпитването (ден 0) и един път седмично по време на изпитването за минимум четири проби. Препоръчва се, също така, всяка една изпитвана концентрация да бъде анализирана по време на подготовката на системата, преди започването на изпитването, за да се провери действието на системата. Освен това се препоръчва изходните разтвори да се анализират когато се изменят, особено ако обемът на изходния разтвор не предоставя достатъчно количество химикал така, че да обхваща продължителността на рутинните периоди на вземане на проби. В случай на химикали, които не могат да бъдат открити при някои или при всички концентрации, използвани при изпитването, следва да се измерят изходните разтвори и да се запише дебитът на системата, за да се изчислят номиналните концентрации.

Доставка на химикал

15. Методът, използван за въвеждане на изпитвания химикал в системата, може да варира в зависимост от неговите физични и химични свойства. Разтворимите във вода химикали могат да бъдат разтворени в аликвотни части вода за изпитване при концентрация, която позволява доставка при целевата концентрация на изпитване при проточна система. Химикали, които са в течно състояние при стайна температура и умерено разтворими във вода, могат да бъдат въведени с методи със сатуратор течност-течност. Химикали, които са в твърдо състояние при стайна температура и умерено разтворими във вода, могат да бъдат въведени със сатуратор с колона със стъклена вата (7). За предпочитане е да се използва система за изпитване без носител, но отделните изпитвани химикали имат различни физични и химични свойства, които вероятно ще изискват различни подходи за подготвяне на водата за експозиция на химикала. За препоръчване е да бъдат

▼ M6

положени усилия за избягване на разтворители или носители, защото: *i*) някои разтворители сами по себе си могат да доведат до токсичност и/или нежелан или непредвиден ендокринен отговор, *ii*) изпитването на химикали на равнища над разтворимостта им във вода (както може често да се случи при използването на разтворители) може да доведе до неточно определяне на ефективните концентрации, и *iii*) употребата на разтворители в по-дългосрочните изпитвания може да доведе до значително „образуване на биофилм“, свързано с микробната активност. За трудни за изпитване химикали могат да се използват разтворители в краен случай, и за определяне на най-добрия метод следва да бъде консултиран документът на ОИСР с насоки за изпитване за токсичност във водна среда на трудни вещества и смеси (4). Изборът на разтворител се определя в зависимост от химичните свойства на химикала. Разтворители, за които е установено, че са ефективни за изпитване за водна токсичност, включват ацетон, етанол, метанол, диметилформамид и триетиленгликол. В случай, че се използва разтворител за носител, концентрациите на разтворителя трябва да бъдат под хроничната концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC); Документът на ОИСР с насоки препоръчва максимум от 100 µl/l; в неотдавнашен преглед се препоръчва използване на разтворител с концентрация само 20 µl на литър вода за разреждане (12). Ако се използва разтворител за носител, следва да се оценят подходящи контроли на разтворител в допълнение към контролите без разтворител (чиста вода). Ако прилагането на химикала чрез водата не е възможно — поради физични или химични характеристики (малка разтворимост) или поради ограничена наличност на химикала — може да бъде взето предвид въвеждането чрез хранителния режим. Върху експозицията чрез хранителния режим има извършена предварителна работа; независимо от това, използването на този път на експозиция не е обичайно. Изборът на метод следва да бъде документирано и проверено по аналитичен път.

Избор на концентрации на изпитване*Определяне на висока концентрация на изпитване*

16. За целите на това изпитване високата изпитвана концентрация трябва да се определи от прага на разтворимост на изпитвания химикал; максимално поносимата концентрация (МПК) за остро токсични химикали; или 100 mg/l, в зависимост от това коя е най-ниска.
17. МПК се определя като най-високата изпитвана концентрация на химикала, която води до по-малко от 10 % смъртност в резултат от остра токсичност. При използването на този подход се допуска, че са налице емпирични данни за смъртността от остра токсичност, от които може да се оцени МПК. Оценката на МПК може да бъде неточна и обикновено се изисква определена професионална преценка. Въпреки че използването на регресионни модели може да е най-издържаният в техническо отношение подход за оценяване на МПК, полезна апроксимация на МПК може да бъде изведена от съществуващите данни за остра токсичност, като се използва 1/3 от стойността на LC₅₀ за остра токсичност. Въпреки това, възможно е да липсват данни за остра токсичност за изпитваните животински видове. Ако липсват специфични за съответния животински вид данни за остра токсичност, може да бъде извършено 96-часово изпитване за определяне на LC₅₀ с попови лъжички, които са представителни за изпитваните в ИМЗ (т.е., са на същия етап на развитие). Като вариант, ако са налични данни за други водни видове (напр. изследвания за LC₅₀ за риби, или за други земноводни видове), тогава може да се използва професионална преценка за оценка на вероятната МПК въз основа на екстраполация между отделните видове.
18. Като алтернатива, ако химикалът не предизвиква остра токсичност и разтворимостта му е над 100 mg/l, тогава следва 100 mg/l да се приеме за най-високата изпитвана концентрация, тъй като тази концентрация обикновено се счита за „практически нетоксична“.

▼ M6

19. Въпреки че не се препоръчват като процедура, статичните методи с обновяване могат да бъдат използвани, когато проточните методи са неподходящи за постигането на МПК. Ако се използват статични методи с обновяване, стабилността на концентрацията на изпитвания химикал следва да бъде документирана и да остава в границите на критериите за параметрите. Препоръчват се двадесет и четири периода на обновяване. Периоди на обновяване, надвишаващи 72 часа, са неприемливи. Освен това параметрите за качество на водата (например DO, температура, рН и т.н.) следва да се измерват в края на всеки период на обновяване, непосредствено преди обновяването.

Диапазон от концентрации на изпитване

20. Изискват се *най-малко* три концентрации на изпитване и контрола с чиста вода (и контрола на носител, ако е необходимо). Минималната разлика между най-високата и най-ниската концентрация на изпитване следва да бъде около един порядък. Максималното разделяне на дозите е 0,1, а минималното е 0,33.

ПРОЦЕДУРА**Започване и провеждане на изпитването***Ден 0*

21. Експозицията следва да започне, когато достатъчно на брой попови лъжички в изходната популация преди експозицията са достигнали етап на развитие 51 по Nieuwkoop и Faber (8), и когато същите са на възраст по-малко или равна на 17 дни след оплождането. За подбор на екземпляри за изпитването, в единичен съд, съдържащ подходящ обем вода за разреждане, следва да се обединят здрави попови лъжички изходната популация, с нормален външен вид. За определяне на етапа на развитие поповите лъжички следва да бъдат отстранени с малка мрежа или сито от съда, в който са били обединени, и прехвърлени в прозрачна измервателна камера (например 100 mm блюдо на Петри), съдържаща вода за разреждане. Предпочита се за определяне на етапа да не се използва анестезия, но може да се използва индивидуална анестезия на поповите лъжички с 100 mg/l трикаинметансулфонат (напр. MS-222), подходящо буфериран с натриев бикарбонат (рН 7,0) преди обработката. Ако се използва, следва от опитни лаборатории да се получи методология за използване, напр. на MS-222, по подходящ начин, и да се протоколира заедно с резултатите от изпитването. По време на това прехвърляне с животните трябва да се борави внимателно, за да се сведе до минимум стресът от боравенето, както и да се избегне каквото и да е увреждане.
22. Етапът на развитие на животните се определя като се използва бинокюларен стереомикроскоп. За намаляване на крайното вариране в етапа на развитие, важно е това определяне на етапа да се провежда колкото е възможно по-точно. Според Nieuwkoop и Faber (8) основният ориентир за развитието при подбор на организми на етап 51 е морфологията на задните крайници. Морфологичните характеристики на задните части следва да бъдат изучени под микроскоп. Въпреки че за изчерпателна информация относно определянето на етапа на развитие при поповите лъжички следва да бъде консултирано ръководството по Nieuwkoop и Faber (8), може надеждно да се определи етапът, като се използват видими морфологични ориентирни. Следната таблица може да бъде използвана за опростяване и стандартизиране на процедурата за определяне на етапа чрез определяне на видими морфологични ориентирни, свързани с различни етапи, като се допуска нормално развитие.

▼ M6

Таблица 2

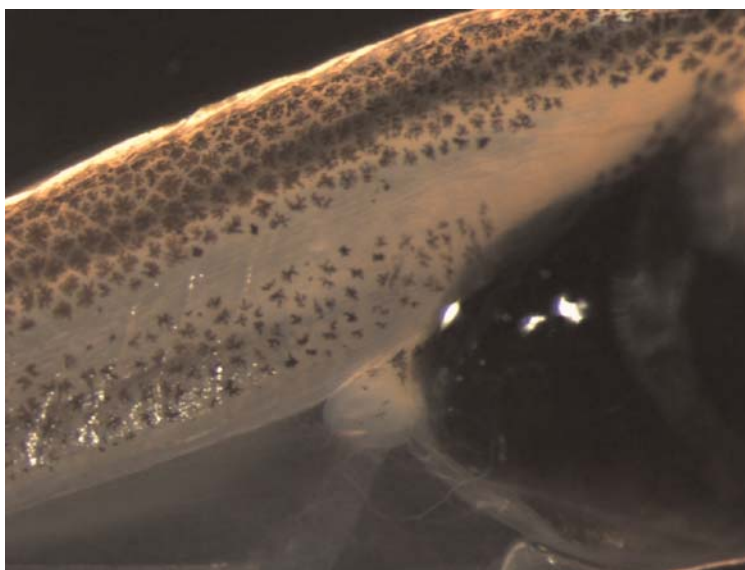
Видими морфологични ориентир за определяне на етапа съгласно насоките на Neuwkoop и Faber.

Видими морфологични ориентир	Етап на развитие															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Задни крайници	X	X	X	X	X	X	X									
Предни крайници						X	X	X	X	X						
Черепно-лицева структура										X	X	X	X			
Морфология на обонятелен нерв											X	X	X			
Дължина на опашката													X	X	X	X

23. За започване на изпитването всички попови лъжички трябва да са на етап 51. Най-видимият морфологичен ориентир за определяне на посочения етап е морфологията на задните крайници, която е показана на фигура 1.

Фигура 1.

Морфология на задните крайници на попова лъжичка на *X. laevis* на етап 51.



24. В допълнение към избора на етапа на развитие може да се използва незадължителен подбор по размера на екземплярите за изпитване. За тази цел цялата дължина на тялото (не SVL) следва да се измери в ден 0 за подпроба от приблизително 20 попови лъжички на етап 51 по NF. След изчисляване на средната цялостна дължина на тялото за тази група животни, минималните и максималните граници за цялостната дължина на тялото на опитните животни може да се определи, като се даде интервал около средната стойност ± 3 mm (средните стойности на цялостната дължина на тялото са в диапазон от 24,0 до 28,1 mm за попови лъжички на етап 51). Независимо от това, определянето на етапа е първичният параметър при определяне на готовността на всеки екземпляр за изпитване. Поповите лъжички, показващи видими макроскопски дефекти или увреждания, следва да бъдат изключени от изследването.

▼ **M6**

25. Поповите лъжички, които отговарят на критериите за етапа, описани по-горе, се държат в съд с чиста вода за отглеждане до приключване на процеса на определяне на етапа. След приключване на определянето на етапа ларвите се разпределят на случаен принцип към съдове за третиране с експозиция до запълване на всеки такъв съд с 20 ларви. Сред това всеки съд за третиране се проверява за животни с аномален външен вид (напр. увреждания, необичаен начин на плуване и т.н.). Поповите лъжички с явно нездрав външен вид следва да бъдат отстранявани от съдовете за третиране и заменени с новоизбрани ларви от съда, в който са били обединени.

Наблюдения

26. За по-подробна информация относно процедурите за приключване на изпитването и обработката на поповите лъжички вж. Ръководството на ОИСП за тиреоидна хистология на земноводни (9).

Измервания на Ден 7

27. В ден 7 пет случайно избрани попови лъжички от всяко повторение се отстраняват от всеки съд за изпитване. Използваната процедура с избор на случаен принцип следва да предоставя равен шанс за избиране на всеки изпитван организъм. Това може да се постигне чрез използване на произволен метод за рандомизация, но се изисква всяка попова лъжичка да бъде уловена с мрежа. Поповите лъжички, които не са избрани, се връщат в първоначалния съд, избраните попови лъжички се подлагат на евтаназия по хуманен начин в 150 до 200 mg/l, напр. MS-222, подходящо буфериран с натриев бикарбонат за постигане на pH 7,0. Подложените на евтаназия попови лъжички се промиват с вода и водата се попива, след което се определя телесното тегло с точност до милиграм. За всяка попова лъжичка се определят дължината на задните крайници, дължината от върха на муцуната до клоачния отвор и етапът на развитие (като се използва бинокулярен стереомикроскоп).

Ден 21 Измервания (Приключване на изпитването)

28. При приключването на изпитването (ден 21) останалите попови лъжички се отстраняват от съдовете за изпитване и се подлагат на евтаназия по хуманен начин в 150 до 200 mg/l, напр. MS-222, подходящо буфериран с натриев бикарбонат, както е посочено по-горе. Поповите лъжички се промиват с вода и водата се попива, след което се определя телесното тегло с точност до милиграм. За всяка попова лъжичка се измерват етапът на развитие, дължината от върха на муцуната до клоачния отвор и дължината на задните крайници.
29. Всички ларви се поставят във фиксатор на Davidson за 48 до 72 часа или като проби с цяло тяло, или като проби от тъкан с почистена глава, съдържащи долната челюст за хистологична оценка. Като проби за хистопатологията се вземат общо пет попови лъжички от всеки съд с повторение. Тъй като височината на фоликуларната клетка зависи от етапа (10), най-подходящият подход за вземане на проби за хистологични анализи е да се използват индивиди със съвпадащ етап, когато това е възможно. С цел да се подберат индивиди със съвпадащ етап следва етапът на ларвите да бъде определен преди подбора и последващата обработка за събиране на данни и съхранение. Това е необходимо, тъй като обичайните различия в развитието ще доведат до различни разпределения по етапи в рамките на всеки съд с повторение.
30. Животните, избрани за хистопатология (n=5 от всяко повторение) следва да са еднакви с медианната стойност на етапа от контролите (обединени повторения), когато това е възможно. Ако са налице съдове с повторение с повече от пет ларви на подходящ етап, тогава се избират пет ларви на случаен принцип.

▼ **M6**

31. Ако са налице съдове с повторение с по-малко от пет ларви на подходящ етап, тогава като извадка следва да бъдат взети на случаен принцип индивиди от следващия надолу или нагоре етап на развитие, до достигане на общ размер на извадката от пет ларви на повторение. За предпочитане е решението за подбор на извадка от допълнителни ларви или от следващия надолу, или от следващия нагоре етап на развитие, да се прави въз основа на цялостна оценка на разпределението на етапите в контролата и при третиранията с химикала. Това означава, че ако третирането с химикала е свързано със забавяне на развитието, тогава извадката от допълнителните ларви следва да бъде взета от следващия надолу етап. Обратно, ако третирането с химикала е свързано с ускоряване на развитието, тогава извадката от допълнителните ларви следва да бъде взета от следващия нагоре етап.
32. В случаи на тежки изменения в развитието на поповите лъжички, дължащи се на третирането с изпитвания химикал, може да не е налице припокриване на разпределението на етапите в третиранията с изчислената медианна стойност на етапа на развитие от контролите. Само в тези случаи процесът на подбор следва да бъде модифициран чрез използване на етап, различен от медианната стойност на етапа от контролите, за постигане на извадки от ларви със съвпадащ етап за тиреоидната хистопатология. Освен това, ако етапите са неопределени (т.е., асинхронност), тогава за хистологичен анализ следва на случаен принцип да се изберат 5 попови лъжички от всяко повторение. Обосновката за извадка от ларви, които не са на етап, равностоеен на медианната стойност на етапа на развитие от контролите, следва да бъде протоколирана.

Определяне на биологични крайни точки

33. По време на 21-дневната фаза на експозиция измерването на първичните крайни точки се извършва в дни 7 и 21, но е необходимо ежедневно наблюдение на изпитваните индивиди. В таблица 3 е даден преглед на крайните точки на измерване, както и на съответните моменти на извършване на наблюдение. По-подробна информация за техническите процедури за измерване на апикални крайни точки и за хистологични оценки може да се намери в документите с насоки на ОИСП (9).

Таблица 3.

Моменти на извършване на наблюдение за първични крайни точки в ИМЗ.

Апикални крайни точки	Ежедневно	Ден 7	Ден 21
— Смъртност	•		
— Етап на развитие		•	•
— Дължина на задни крайници		•	•
— Дължина от върха на муцуната до клоачния отвор		•	•
— Мокро телесно тегло		•	•
— Хистология на щитовидна жлеза			•

▼ **M6****Апикални крайни точки**

34. Етап на развитие, дължина на задни крайници, SVL и мокро тегло са апикалните крайни точки на ИМЗ, като всяка от тях е обсъдена накратко по-долу. По-нататъшна техническа информация за събирането на тези данни е на разположение в документите с насоки, към които е оване, включително процедури за анализ с компютърни програми, които се препоръчват за използване.

Етап на развитие

35. Етапът на развитие на попови лъжички на *X. laevis* се определя с използване на критериите за определяне на етапи по Nieuwkoop и Faber (8). Данните за етапа на развитие се използват, за да се определи дали развитието е ускорено, асинхронно, забавено или неза-сегнато. Ускорението или забавянето на развитието се определят чрез сравнение на средната стойност на етапа, достигнат от контролата и третираните групи. Асинхронно развитие се протоколира, когато изследваните тъкани не са деформирани или аномални, но относителното разпределяне на морфогенезата или развитието на различни тъкани във времето е нарушено в рамките на отделна попова лъжичка.

Дължина на задни крайници

36. Диференциацията и растежът на задните крайници се контролират от тиреоидни хормони и са основни ориентири за развитието, вече използвани при определянето на етапа на развитие. Развитието на задните крайници се използва в качествено отношение при определяне на етапа на развитие, но тук се разглежда като количествена крайна точка. Поради това дължината на задните крайници се измерва като крайна точка за откриване на въздействия върху тиреоидната ос (фигура 2). С оглед на последователността дължината на задните крайници се измерва по левия заден крайник. Дължината на задните крайници се оценява както на ден 7, така и на ден 21 от изпитването. На ден 7 измерването на дължината на задните крайници е просто, както се вижда на фигура 2. Измерването на дължината на задните крайници в ден 21 обаче е по-сложно поради извивките на крайника. Следователно измерванията на дължината на задните крайници в ден 21 трябва да започват от телесната стена и да следват средната линия на крайника по всички ъглови отклонения. Измененията в дължината на задните крайници в ден 7, макар и това да не е очевидно на ден 21, все още се считат за значими за потенциална тиреоидна активност. Измерванията на дължината се правят от цифрови снимки, с използване на софтуер за анализ на изображения, както е описано в Ръководството на ОИСП за тиреоидна хистология на земноводни (9).

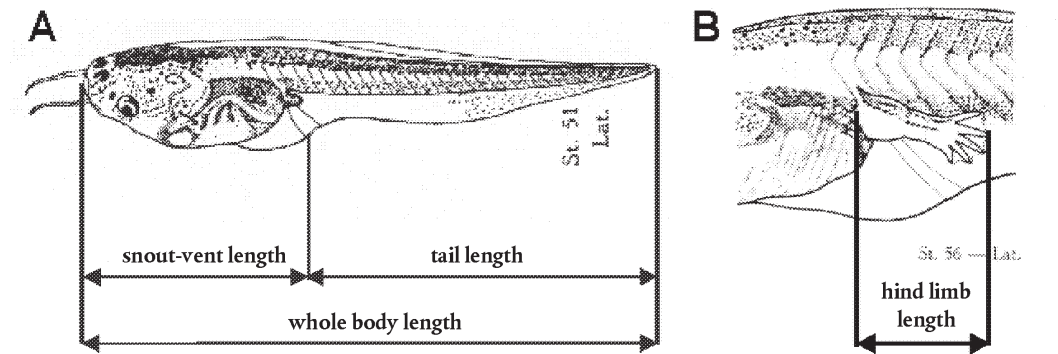
Дължина на тялото и мокро тегло

37. Определянето на дължината от върха на муцуната до клоачния отвор (SVL) (фигура 2) и мокрото тегло са включени в протокола от изпитването за оценка на възможните въздействия на изпитваните химикали върху растежа на поповите лъжички в сравнение с контролата и са полезни за откриването на обща токсичност на изпитвания химикал. Тъй като отстраняването на прилежащата вода за определяне на теглото може да предизвика стресиращи условия за поповите лъжички и може да причини увреждания на кожата, измерванията се извършват на ден 7 върху поповите лъжички от подпробата, а върху всички останали попови лъжички — при приключване на изпитването (ден 21). С оглед на последователността при измерването краниалният аспект на клоачния отвор се използва като каудален край.
38. Дължината от върха на муцуната до клоачния отвор (SVL) се използва, за да се оцени растежът на поповите лъжички, както е показано на фигура 2.

▼ M6

Фигура 2.

(А) Видове измервания на дължината на тялото и (Б) Измерване на дължината на задните крайници на попови лъжички на *X. laevis* (1).



Хистология на щитовидна жлеза

39. Независимо от това, че дължината от върха на муцуната до клоачния отвор и дължината на задните крайници са важни крайни точки за оценка на измененията в развитието, само по себе си забавянето на развитието не може да се счита за диагностичен показател за анти-тиреоидна активност. Някои изменения могат да се наблюдават само при рутинен хистопатологичен анализ. Диагностични критерии включват хипертрофия/атрофия на щитовидната жлеза, хипертрофия на фоликуларни клетки, хиперплазия на фоликуларни клетки и, като допълнителни качествени критерии: област на фоликуларния лумен, качеството на колоидите и височина/форма на фоликуларните клетки. Скалата на степените на тежест на измененията (4 степени) следва да се протоколира. Информация за получаване и обработка на проби за хистологичен анализ и за извършване на хистологични анализи на тъканни проби е на разположение в „Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 — Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation“ и „Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 — Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas“ (9). Лаборатории, извършващи изследването за първи път, следва да търсят съвети от опитни патолози за обучение преди извършване на хистологичен анализ и оценка на щитовидната жлеза. Явни и значими промени в апикалните крайни точки, показващи ускорение или асинхронност на развитието, могат да изключат необходимостта от извършване на хистопатологичен анализ на щитовидната жлеза. Липсата на ясно изразени морфологични изменения или доказателства за забавяне на развитието обаче налагат хистологичен анализ.

Смъртност

40. Всички съдове за изпитване следва да се проверяват ежедневно за мъртви попови лъжички, а броят се записва за всеки съд. Следва да се записват датата, концентрацията и номерът на всеки съд за всяко наблюдение на смъртност. Мъртвите екземпляри следва да се отстраняват от съда за изпитването незабавно след забелязването им. Смъртност, превишаваща 10 %, може да показва неподходящи условия на изпитването или токсични въздействия, предизвикани от изпитвания химикал.

Допълнителни наблюдения

41. Случаите на аномално поведение и макроскопски видими малформации и увреждания следва да бъдат записани. Следва да се записват датата, концентрацията и номерът на всеки съд при аномално поведение и макроскопски видими малформации и увреждания. Нормалното поведение се характеризира с попови лъжички,

▼ **M6**

суспендирани във водната колона, с опашка, повдигната над главата, редовни ритмични движения на опасния плавник, периодично излизане на повърхността, подвижен оперкулум и реагиране на стимули. Необичайно поведение може да включва например плаване на повърхността, лежане на дъното на съда, обърнато или неправилно плуване, липса на активност по излизане на повърхността и нереагиране на стимули. В допълнение, брутните разлики в потреблението на храна между третираните следва да се записват. Макроскопските малформации и увреждания могат да включват морфологични аномалии (напр. деформации на крайници), хеморагични увреждания, бактериални или гъбични инфекции, както и много други. Тези определения са качествени и следва да се считат за близки до клиничните признаци за заболяване/стрес и да се правят в сравнение с индивидите в контролите. Ако появата или честота на поява е по-голяма в експонираните съдове, отколкото в контролите, тогава те следва да се разглеждат като доказателство за ясно изразена токсичност.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Събиране на данни**

42. Всички данни следва да бъдат събирани чрез електронни системи или системи за ръчно събиране, които отговарят на изискванията за добри лабораторни практики (ДЛП). Данните от изследването следва да включват:

Изпитван химикал:

- Характеризиране на изпитвания химикал: физични и химични свойства; информация за стабилността и биоразградимостта;
- Информация и данни за химикала: метод и честота на изготвяне на разрежданията. Информацията за изпитвания химикал включва действителни и номинални концентрации на изпитвания химикал и, в някои случаи, неизходен химикал, когато е необходимо. За изходните разтвори, както и за изпитваните разтвори, може да се изискват измервания на изпитвания химикал;
- Разтворител (ако е различен от вода): обосновка на избора на разтворител и характеризирание на разтворителя (природа, използвана концентрация);

Условия на изпитването:

- Работни записи: те се състоят от наблюдения, свързани с функционирането на системата за изпитване и поддържащата среда и инфраструктура. Типичните записи включват: температура на околната среда, температура на изпитването, период на осветеност, състояние на критичните компоненти на системата за експозиция (например помпи, броячи на цикли, налягане), дебит, нива на водата, изменения при съдовете с изходните разтвори и записи за храненето. Общите параметри за качество на водата включват: рН, DO, проводимост, общ йод, алкалност и твърдост;
- Отклонения от метода на изпитването: тази информация следва да включва информация или текстово описание на отклоненията от метода за изпитване;

Резултати:

- Биологични наблюдения и данни: те включват ежедневни наблюдения на смъртност, консумация на храна, необичаен начин на плуване, летаргия, загуба на равновесие, деформации, увреждания и други. Наблюденията и данните, събирани на предварително определени интервали, включват: етап на развитие, дължина на задни крайници, дължина от върха на муцуната до клоачния отвор и мокро тегло;

▼ **M6**

- Статистически техники за анализ и обосноваване на използването на тези техники; резултати от статистическия анализ, за предпочитане в таблична форма;
- Хистологични данни: те включват текстово описание, както и степенувана тежест на уврежданията и поява на специалните наблюдения, както е описано подробно в документа с ръководството по хистопатология;
- Наблюдения *ad hoc*: тези наблюдения следва да включват текстови описания на изследването, които не попадат в описаните по-горе категории.

Протоколиране на данни

43. В допълнение 2 се съдържат формуляри за ежедневно събиране на данни, които могат да бъдат използвани като насоки за въвеждане на необработени данни и за изчисляване на обобщени статистически данни. Освен това са представени таблици за протоколиране, които са удобни за съобщаване на обобщения на данните за крайните точки. Таблиците за протоколиране за хистологичните оценки могат да бъдат намерени в допълнение 2.

Критерии за параметрите и приемливост/валидност на изпитването

44. Като правило, големите отклонения от метода за изпитването ще доведат до неприемливи данни за интерпретиране или протоколиране. Следователно, следните критерии в таблица 4 са разработени като насоки за определяне на качеството на извършеното изпитване и общите параметри на контролните организми.

Таблица 4

Критерии за параметрите на ИМЗ

Критерий	Допустими граници
Концентрации на изпитване	Поддържа се при $\leq 20\%$ CV (вариация на измерената концентрация на изпитване) по време на 21-дневното изпитване.
Смъртност при контролите	$\leq 10\%$ — смъртността във всяко едно повторение при контролите не трябва да превишава 2 попови лъжички
Минимална медианна стойност на етапа на развитие от контролите в края на изпитването	57
Размах на етапа на развитие в контролна група	Стойностите на 10-я и 90-я процентил от разпределението на етапите на развитие следва да се различават с не повече от 4 етапа
Разтворен кислород	$\geq 40\%$ стойност на насищане при равновесие с атмосферния въздух (*)
pH	pH трябва да бъде между 6,5 и 8,5. Разликите в стойностите между повторенията/между третиранията не трябва да превишават 0,5.
Температура на водата	$22^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ — разликите в стойностите между повторенията/между третиранията не трябва да превишават $0,5^{\circ} \text{C}$
Концентрации на изпитване без ясно изразена токсичност	≥ 2
Параметри на повторенията	≤ 2 повторения могат да бъдат изложени на риск по време на изпитването

▼ M6

Критерий	Допустими граници
Специални условия за употреба на разтворител	Ако се използва разтворител за носител, следва да се използват както контрола на разтворител, така и контрола на чиста вода, и резултатите следва да се протоколират
	Статистически значими разлики между групите от контролата на разтворител и от контролата на вода се третира специално. За повече информация вж. по-долу
Специални условия за статичната система с обновяване	Представителните химични анализи преди и след обновяване следва да се протоколират
	Равнищата на амоняк трябва да се измерват непосредствено преди обновяване
	Всички параметри за качество на водата, изброени в таблица 1 от допълнение 1, следва да се измерват непосредствено преди обновяване
	Периодът за обновяване не следва да надвишава 72 часа
	Подходящ график на хранене (50 % от дневната дажба храна за попови лъжички от търговската мрежа)
(*) Аерирането на водата може да се поддържа чрез барботиращи апарати. Препоръчително е барботиращите апарати да се настройват на равнища, които не създават ненужен стрес за поповите лъжички.	

Валидност на изпитването

45. Следните изисквания трябва да бъдат изпълнени, за да се приеме дадено изпитване за приемливо/валидно:

При валиден опит от изпитване е получен отрицателен резултат за тиреоидна активност:

- (1) За всяко дадено третиране (включително и контролите) смъртността не може да надхвърля 10 %. За всяко отделно повторение смъртността не може да надхвърля три попови лъжички, в противен случай повторението се смята за изложено на риск
- (2) Най-малко две равнища на третиране, като и всичките четири неизложени на риск повторения, следва да са налични за анализ
- (3) Най-малко две равнища на третиране без ясно изразена токсичност следва да са налични за анализ

При валиден опит от изпитване е получен положителен резултат за тиреоидна активност:

- (1) В контролната група може да бъде получена смъртност от не повече от две попови лъжички/повторение

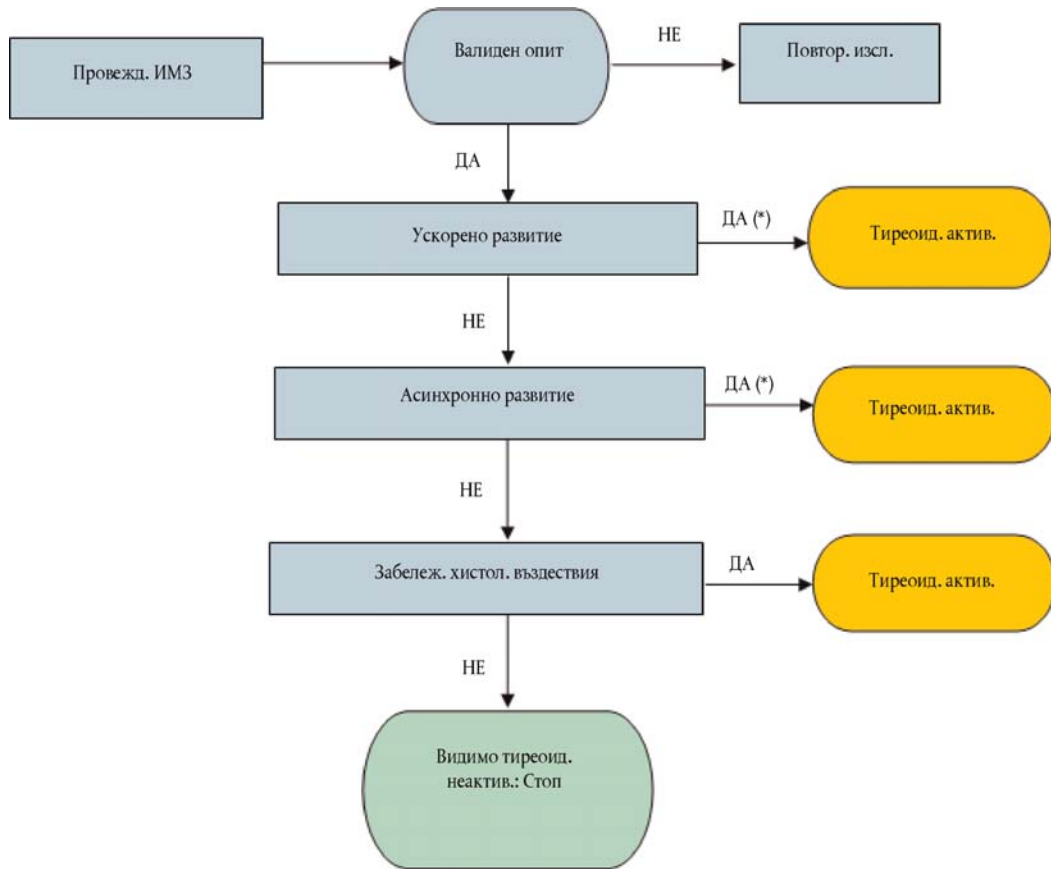
Схема за вземане на решения за провеждането на ИМЗ

46. За провеждането на ИМЗ беше разработена схема за вземане на решения, за предоставяне на логическа помощ в провеждането на изпитването и интерпретирането на резултатите от биологичното изследване (вж. диаграмата на фигура 3). Схемата за вземане на решения по същество претегля крайните точки, като дава голяма тежест на ускореното и асинхронното развитие и тиреоидната хистопатология, и по-малка тежест на забавеното развитие, дължината от върха на муцуната до клоачния отвор и мокротото тегло — параметри, които потенциално могат да бъдат повлияни от обща токсичност.

▼ M6

Фигура 3.

Схема за вземане на решения за провеждането на ИМЗ.



(*) Някои регулаторни органи могат да изискват хистология независимо от значимите разлики в ускореното и асинхронното развитие. Субектът, извършващ това изпитване, се насърчава да се консултира с необходимите органи преди провеждане на изпитването, за да определи кои крайни точки са необходими.

Ускорено развитие (определено с помощта на етапа на развитие, SVL и HLL)

47. Известно е, че ускореното развитие се наблюдава само при въздействия, свързани с тиреоидни хормони. Това могат да бъдат въздействия върху периферна тъкан, като например прякото взаимодействие с рецептора за тиреоидния хормон (като например с T4) или въздействия, които изменят равнищата на циркулиращите тиреоидни хормони. И в двата случая това се счита за достатъчно доказателство, за да се покаже, че химикалът притежава тиреоидна активност. Ускореното развитие се оценява по един от следните два начина. Първо, общият етап на развитие може да бъде оценен с помощта на стандартизирания подход, посочен в Nieuwkoop и Faber (8). На второ място, специфичните морфологични характеристики могат да бъдат определени количествено, като например дължина на задни крайници както през ден 7, така и през ден 21, което се свързва положително с агонистични въздействия върху рецептора за тиреоидния хормон. Ако бъде получено статистически значимо ускоряване в развитието, или в дължината на задните крайници, тогава изпитването показва, че химикалът притежава тиреоидна активност.

▼ M6

48. Оценката на изпитваните индивиди за наличие на ускорено развитие, сравнено с популацията в контролата, се основава на резултатите от статистическите анализи, извършени за следните четири крайни точки:
- дължина на задните крайници (нормализирана чрез SVL) на ден 7 от изследването
 - дължина на задните крайници (нормализирана чрез SVL) на ден 21 от изследването
 - етап на развитие на ден 7 от изследването
 - етап на развитие на ден 21 от изследването.
49. Статистическите анализи на дължината на задните крайници следва да се извършват въз основа на измерванията на дължината на левия заден крайник. Дължината на задните крайници се нормализира, като се вземе съотношението дължина на задните крайници към дължина от върха на муцуната до клоачния отвор на дадения индивид. След това средната стойност на нормализираните стойности за всяко ниво на третиране се сравняват. Тогава показател за ускоряване на развитието е значителното увеличение на средната дължина на задните крайници (нормализирана) в дадена третирана с химикал група в сравнение с контролната група на ден 7 и/или ден 21 от изследването (вж. допълнение 3).
50. Статистическите анализи на етапа на развитие следва да се извършват въз основа на определяне на етапите на развитие въз основа на морфологичните критерии, описани от Nieuwkoop и Faber (8). Показател за ускоряване на развитието е когато посредством анализ на данни с полиномно разпределение е установено значимо увеличение на средната дължина на задните крайници (нормализирана) в дадена третирана с химикал група в сравнение с контролната група в ден 7 и/или ден 21 от изследването (вж. допълнение 3).
51. В метода за изпитване ИМЗ значимото въздействие върху някоя от четирите крайни точки, посочени по-горе, се приема за достатъчно за положителен резултат за откриване на ускорено развитие. Това означава, че при съществени въздействия върху дължината на задните крайници в определена времева точка не се изисква потвърждаване от значително въздействие върху дължината на задните крайници в алтернативната времева точка, нито от значими въздействия върху етапа на развитие в тази конкретна времева точка. Обратно, при значими въздействия върху етапа на развитие в определена времева точка не се изисква потвърждаване от значими въздействия върху етапа на развитие в алтернативната времева точка, нито от значими въздействия върху дължината на задните крайници в тази конкретна времева точка. Тежестта на доказателствата за ускорено развитие все пак ще се увеличи, ако бъдат открити значими въздействия за повече от една крайна точка.

Асинхронно развитие (определено с помощта на критерии за етапа на развитие)

52. Асинхронното развитие се характеризира с това, че относителното разпределение на морфогенезата или развитието на различни тъкани във времето е нарушено в рамките на отделна попова лъжичка. Невъзможността за ясно установяване на етапа на развитие на един организъм, при използване на набора от морфологични крайни точки, смятан за типичен за всеки отделен етап, показва, че тъканите се развиват асинхронно по време на метаморфозата. Асинхронното развитие е показател за тиреоидна активност. Единствените известни действия, водещи до асинхронно развитие, са чрез въздействия на химикали върху дейността на периферните тиреоидни хормон и/или метаболизма на тиреоидните хормони при развитието на тъкани, каквито се наблюдават и при инхибитори на дейодиназата.

▼ M6

53. Оценката на изпитваните индивиди за наличие на асинхронно развитие в сравнение с популацията в контролата се основава на макроскопска морфологична оценка на изпитваните индивиди в ден 7 и ден 21 от изследването.
54. Описанието на нормалното развитие на *Xenopus laevis* от Nieuwkoop и Faber (8) дава рамката за определяне на последователността на настъпването на промените в тъканите при нормално развитие. Терминът „асинхронно развитие“ се отнася специално за тези отклонения в макроскопското морфологично развитие на поповите лъжички, които не дават възможност за окончателно определяне на етапа на развитие в съответствие с критериите на Nieuwkoop и Faber (8), тъй като ключови морфологични ориентирите сочат характеристики на различни етапи.
55. Следва да се разглеждат само случаи, показващи отклонения в хода на настъпването на промените в специфични тъкани, в сравнение с хода на настъпването на промените в други тъкани, каквото е и съдържанието на термина „асинхронно развитие“. Някои класически фенотипове включват забавяне или липса на поява на предни крайници, независимо от нормалното или ускорено развитие на задните крайници и опашните тъкани, или преждевременна резорбция на хрилете по отношение на етапа на морфогенезата на задните крайници и резорбцията на опашката. Индивидът се записва като показващ асинхронно развитие, ако не може да му бъде определен етап, тъй като той не отговаря на повечето от служещите като ориентир критерии за развитието за даден Nieuwkoop и Faber етап (8), или ако има изключително забавяне или ускоряване на една или повече ключови характеристики (напр. пълна резорбция на опашката без да са се появили предни крайници). Тази оценка се извършва в качествено отношение и следва да включва разглеждане на пълния набор от ориентирите, посочени от Nieuwkoop и Faber (8). Независимо от това не е необходимо да се записва развитието на различните ориентирите на наблюдаваните индивиди. За индивидите, записани като показващи асинхронно развитие, не се определя етап на развитие по Nieuwkoop и Faber (8).
56. По този начин основен критерий за определяне на случаите на необичайно морфологично развитие като „асинхронно развитие“ е, че относителното разпределяне на промените в тъканите и на морфогенезата на тъканите във времето е нарушено, докато морфологията на повлияните тъкани не е видимо необичайна. Един пример, който илюстрира това тълкуване на макроскопски морфологични аномалии, е че забавена морфогенеза на задните крайници спрямо развитието на други тъкани отговаря на критерия за „асинхронно развитие“, докато случаи, показващи липсващи задни крайници, необичайни пръсти (напр. ектродактилия, полидактилия) или други явни малформации по краката не следва да се разглеждат като „асинхронно развитие“.
57. В този контекст, основните морфологични ориентирите, които следва да бъдат оценени за тяхната координирана метаморфоза, следва да включват морфогенеза на задните крайници, морфогенеза на предните крайници, поява на предните крайници, етап на резорбция на опашката (по-специално резорбция на опашния плавник), и морфология на главата (напр. размер на хрилете и етап на резорбция на хрилете, морфология на долната челюст, изпъкване на Мекелов хрущял).
58. В зависимост от начина на действие на химикала могат да се проявят различни макроскопски морфологични фенотипове. Някои класически фенотипове включват забавяне или липса на поява на предни крайници, независимо от нормалното или ускорено развитие на задните крайници и опашните тъкани, преждевременна резорбция на хрилете по отношение на промените в развитието на задните крайници и опашката.

▼ **M6***Хистопатология*

59. Ако химикалът не предизвиква ясно изразена токсичност и не ускорява развитието, нито предизвиква асинхронно развитие, хистопатологията на щитовидните жлези се оценява чрез използване на подходящия документ с ръководство (9). Изоставането в развитието при отсъствие на токсичност е ясен показател за анти-тиреоидна дейност, но анализът на етапа на развитието е по-малко чувствителен и с по-малка диагностична стойност от хистопатологичния анализ на щитовидната жлеза. Следователно, в този случай е необходимо провеждане на хистопатологични анализи на щитовидните жлези. Въздействия върху хистологията на щитовидната жлеза са доказани при отсъствие на въздействия върху развитието. Ако настъпят изменения в тиреоидната хистопатология, тогава се смята, че химикалът показва тиреоидна активност. Ако не се наблюдават забавено развитие или хистологични увреждания в щитовидна жлеза, тогава се смята, че химикалът не показва тиреоидна активност. Обосновката за това решение е, че щитовидната жлеза е под влиянието на TSH и всеки химикал, който променя циркулиращия тиреоиден хормон достатъчно, за да се промени секрецията на TSH, ще доведе до хистопатологични изменения в щитовидните жлези. Циркулиращият тиреоиден хормон може да бъде променен по различни начини и механизми на действие. По този начин независимо от това, че равнището на тиреоиден хормон е показателно за въздействие, свързано с щитовидната жлеза, то е недостатъчно, за да се определи кой начин или механизъм на действие е свързан с отговора.
60. Поради това, че тази крайна точка не се свежда до използване на основни статистически подходи, определянето на въздействието, свързано с експозиция на химикал, се извършва с помощта на експертно становище от патолог.

Забавено развитие (определено с помощта на етапа на развитие, HLL, телесното тегло, SVL)

61. Забавено развитие може да се прояви чрез анти-тиреоидни механизми и чрез пряка токсичност. Леко забавяне на развитието, в съчетание с явни признаци на токсичност, вероятно са показател за неспецифичен токсичен ефект. Оценката на токсичността, различна от тиреоидната, е съществен елемент на изпитването, с оглед намаляване на вероятността от неверни положителни резултати. Прекомерната смъртност е явен признак, че се проявяват други механизми на токсичност. Аналогично, слабо намаление на растежа, определено чрез мокрото тегло и/или SVL, също предполагат токсичност, различна от тиреоидната. Видимото увеличение на растежа обикновено се наблюдава при химикали, които оказват отрицателно въздействие върху нормалното развитие. Следователно присъствието на по-големи индивиди не означава непременно токсичност, различна от тиреоидната. Растежът обаче никога не следва да бъде единствената надеждна основа за определяне на тиреоидната токсичност. За да се определи тиреоидната активност, следва да се използва по-скоро растежът в съчетание с етапа на развитие и тиреоидната хистопатология. Други крайни точки следва също да бъдат взети предвид при определяне на ясно изразената токсичност, включително оток, хеморагични увреждания, летаргия, намалена консумация на храна, изменчив/изменен начин на плуване и други. Ако при всички изпитвани концентрации се проявяват признаци на явна токсичност, изпитваният химикал трябва да бъде повторно оценен при по-ниски концентрации на изпитване, преди да се определи дали химикалът показва или не показва тиреоидна активност.
62. Статистически значимото забавено развитие, при отсъствие на други признаци на ясно изразена токсичност, показва, че химикалът притежава тиреоидна активност (антагонистичен). В отсъствието на голям статистически отклик този резултат може да бъде подсилен с резултатите от тиреоидната хистопатология.

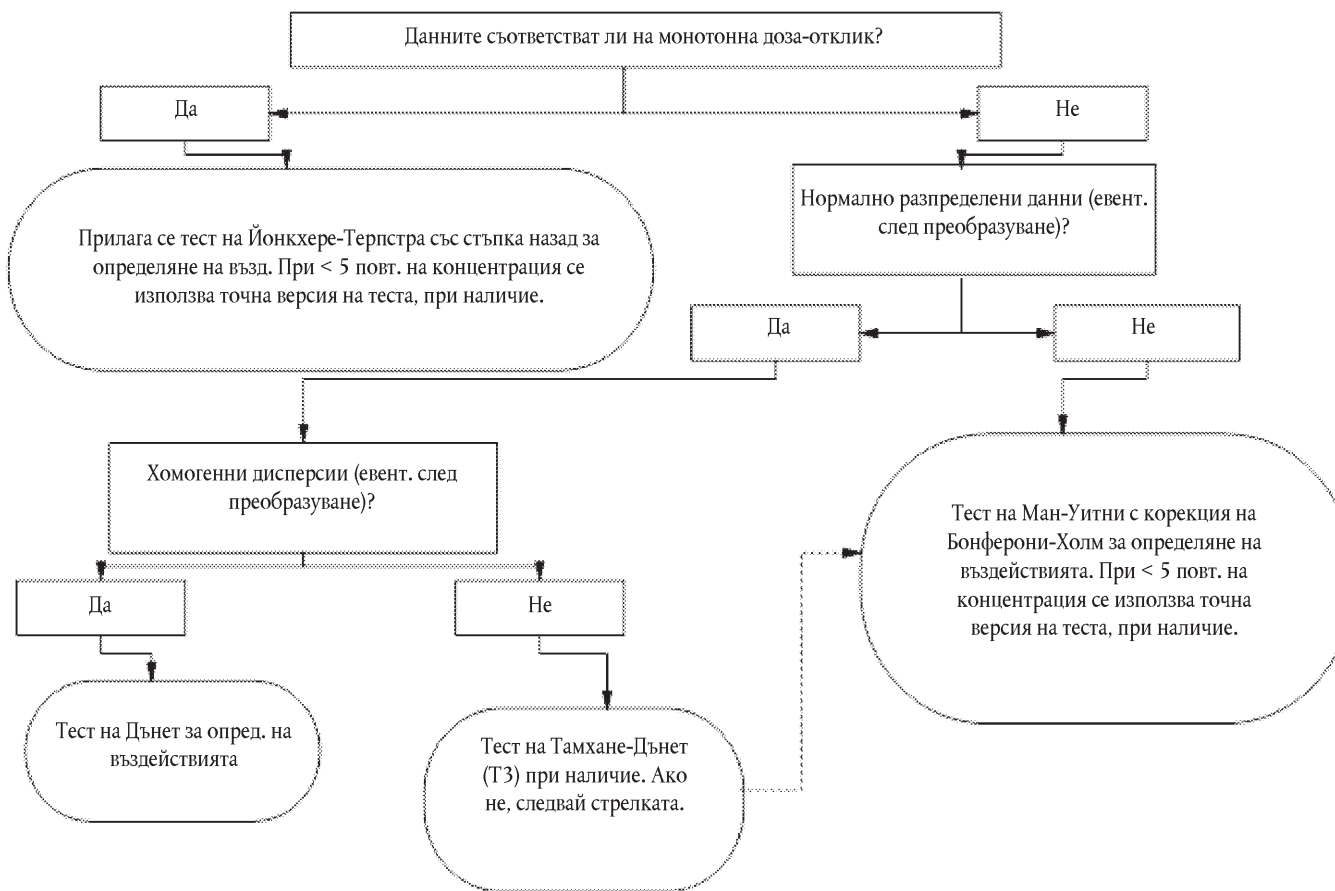
▼ **M6****Статистически анализи**

63. Предпочита се статистическите анализи на данните да следват процедурите, описани в документа „Съвременни подходи за статистически анализ на данни за екоотоксичност: ръководство за прилагане“ (Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application) (11). За всички непрекъснати количествени крайни точки (HLL, SVL, мокро тегло), съответстващи на монотонна зависимост доза-отклик, следва да се прилага тестът на Йонкхере-Терпстра със стъпка назад, за да се установи значимо въздействие от третирането.
64. За непрекъснати крайни точки, които не са съответстващи на монотонна зависимост доза-отклик, данните трябва да бъдат оценени за нормалност (за предпочитане с използване на теста на Шапиро-Уилк или Андерсън-Дарлинг) и за хомогенност на дисперсията (за предпочитане с използване на тест на Левин). И двата теста се извършват с остатъците от ANOVA. Вместо тези формализирани тестове за нормалност и хомогенност на дисперсията може да се използва експертна преценка, въпреки че формализираните тестове са за предпочитане. Когато не е установена нормалност, или е установена хетерогенност на дисперсията, следва да се търси трансформация за нормализиране, стабилизиране на дисперсията. Ако данните (може би след трансформация) са с нормално разпределение и хомогенна дисперсия, значимо въздействие от третирането се определя от теста на Дънет. Ако данните (може би след трансформация) са с нормално разпределение и хетерогенна дисперсия, значимо въздействие от третирането се определя от теста на Тамхане-Дънет (или T3 тест) или от U-теста на Ман-Уитни-Уилкоксон. Когато не може да бъде намерена нормализираща трансформация, значимо въздействие от третирането се определя от U-теста на Ман-Уитни-Уилкоксон с използване на корекция на Бонферони-Холм на р-стойностите. Тестът на Дънет се прилага независимо от всеки ANOVA с използване на F-отношения, а тестът на Ман-Уитни се прилага независимо от всеки общ тест на Кръскал-Уолис.
65. Значима смъртност не се очаква, но тя следва да бъде оценена с теста на Кокрън-Армитидж със стъпка назад, когато данните са съгласувани с монотонността на зависимостта доза-отклик, а в други случаи — с точен тест на Фишер с корекция на Бонферони-Холм.
66. Значимото въздействие от третирането за етапа на развитие се определя с прилагане на теста на Йонкхере-Терпстра със стъпка назад, който се прилага за медианите в повторенията. Като алтернативна възможност, и за предпочитане, за определянето на въздействието следва да се използва тест за данни с полиномно разпределение на Йонкхере от 20-я до the 80-я процентил, тъй като с него се вземат предвид промените в профила на разпределението.
67. Подходящият обект за анализ е повторението, поради което данните се състоят от медиани в повторенията, ако се използва тестът на Йонкхере-Терпстра или U-тестът на Ман-Уитни, или от средни в повторенията, ако се използва тестът на Дънет. Монотонната зависимост доза-отклик може да бъде оценена визуално от средните или медианите в контролите и третираните групи, или от формализирани тестове като описаните по-горе (11). При по-малко от пет повторения на третиране или на контрола следва да се използват точните версии на тестовете на Йонкхере-Терпстра и на Ман-Уитни, ако са налични. Статистическата значимост на всички посочени тестове се преценява на 0,05 ниво на значимост.
68. Фигура 4 представлява схема за извършване на статистически тестове на непрекъснати данни.

Фигура 4.

Схема за статистически подходи при отклик с непрекъснати данни.

Схема за непрекъснат отклик



▼ **M6****Специални съображения, свързани с анализ на данните***Използване на изложени на риск нива на третиране*

69. При определяне дали дадено повторение или цяло третиране показва ясно изразена токсичност и следва да бъде отстранено от анализа, са взети предвид няколко фактора. Ясно изразената токсичност се определя като > 2 случая на смъртност в някое от повторенията, които могат да се обяснят само с токсичност вместо с техническа грешка. Други признаци на ясно изразена токсичност включват кръвоизлив, необичайно поведение, необичайни начини на плуване, анорексия и други клинични признаци на заболяване. За сублетални признаци на токсичност могат да бъдат необходими качествени оценки, при които винаги трябва да се прави позоваване на контролната група на чиста вода.

Контроли на разтворител

70. Използването на разтворител следва да се разглежда само като крайна мярка, след като са разгледани всички други възможности за прилагане на химикала. Ако се използва разтворител, тогава съгласувано с това се провежда изпитване на контрола на чиста вода. При приключване на изпитването следва да се направи оценка на възможното въздействие на разтворителя. Това се прави чрез статистическо сравнение на контролната група на разтворител с контролната група на чиста вода. Най-важните крайни точки за разглеждане в посочения анализ са етапът на развитие, SVL и мокрото тегло, тъй като те могат да бъдат засегнати чрез токсичност, различна от тиреоидната. Ако са открити значими от статистическа гледна точка разлики между контролните групи на чиста вода и на разтворител, крайните точки на изследването за измерване на отклика се определят с използване на контролата на чиста вода. Ако няма значими от статистическа гледна точка разлики между контролните групи на чиста вода и на разтворител по отношение на никоя от измерваните зависимост променливи, крайните точки на изследването за измерване на отклика се определят с използване на обединените контроли на вода за разреждане и на разтворител.

Третирани групи, достигнали етап на развитие 60 и повече

71. След етап на развитие 60 поповите лъжички показват намаление в размера и теглото поради резорбция на тъканта и поради намаляване на абсолютното съдържание на вода. По този начин измерванията на мокро тегло и SVL не могат да бъдат използвани по подходящ начин в статистически анализи за различия в скоростите на растеж. Следователно, данните за мокро тегло и дължинаот организми $> NF 60$ следва да бъдат цензурирани и не могат да се използват при анализи на средни стойности за повторение или медианни стойности за повторение. В анализа на тези свързани с растежа параметри биха могли да се използват два различни подхода.
72. Един възможен подход е за статистически анализ на мокро тегло и/или SVL да се разглеждат само поповите лъжички на етап на развитие по-малък или равен на етап 60. Смята се, че този подход предоставя достатъчно устойчива информация относно тежестта на евентуалните въздействия върху растежа, тъй като само малка част от изпитваните индивиди се отстраняват от анализите ($\leq 20\%$). Ако увеличен брой попови лъжички показва развитие след етап 60 ($\geq 20\%$) в една или повече от една номинална концентрация, тогава към всички попови лъжички следва да се приложи двуфакторен ANOVA с вложен дизайн за оценка на въздействията върху растежа, дължащи се на третирания с химикала, с едновременно отчитане на напредналия етап на развитие върху растежа. В допълнение 3 са дадени насоки относно двуфакторния ANOVA на теглото и дължината.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase I — Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.

▼ M6

- (2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 — Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76. Paris
- (3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92. Paris
- (4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris
- (5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelphia, PA
- (6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay — *Xenopus* (FETAX). E 1439-98
- (7) Kahl, M.D., Russom, C.L., DeFoe, D.L. & Hammermeister, D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. *Chemosphere* 39, pp. 539-551
- (8) Nieuwkoop, P.D. & Faber, J. (1994) Normal Table of *Xenopus laevis*. Garland Publishing, New York
- (9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris
- (10) Dodd, M.H.I. & Dodd, J.M. (1976) *Physiology of Amphibia*. Lofts, B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599
- (11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris
- (12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.69-92.

▼ M6

Допълнение 1

Таблица 1

Условията на опита за 21-дневното изследване за метаморфоза на земноводни

Изпитван индивид	Ларви на <i>Xenopus laevis</i>	
Първоначален етап на ларвите	Етап 51 на Nieuwkoop и Faber	
Период на експозиция:	21 дни	
Критерии за подбор на ларви	Етап на развитие и обща дължина (по избор)	
Концентрации на изпитване	Най-малко 3 концентрации, с диапазон от приблизително един порядък	
Режим на експозиция	Проточен (за предпочитане) и/или статичен с обновяване	
Дебит на системата за изпитване	25 ml/min (пълна замяна на обема приблизително на всеки 2,7 h)	
Първични крайни точки/ дни на определяне	Смъртност	Ежедневно
	Етап на развитие	D 7 и 21
	Дължина на задни крайници	D 7 и 21
	Дължина от върха на муцуната до клоачния отвор	D 7 и 21
	Мокро телесно тегло	D 7 и 21
	Тиреоидна хистология	D 21
Вода за разреждане/лабораторен контрол	Дехлорирана чешмяна вода (филтрувана с въглен) или еквивалентен лабораторен източник	
Гъстота на ларвите	20 ларви/съд за изпитване (5 на литър)	
Разтвор за изпитване/съд за изпитване	4-10 l (минимум 10-15 cm вода) /съдове от стъкло или от неръждаема стомана (напр. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Повторения	4 съда за изпитване с повторения/концентрация на изпитване и контрола	
Приемлив процент на смъртност при контролите	≤ 10 % на съд за изпитване с повторение	
Фиксиране на щитовидната жлеза	Брой фиксирани	Всички попови лъжички (първоначално се оценяват 5/повторение)
	Област	Главата или цялото тяло
	Течност фиксиране за	Фиксатор на Davidson
Хранене	Храни	Sera Micron® или равностойна
	Количество/честота	Вж. таблица 1 за режима на хранене с използване на Sera Micron®
Осветление	Период на осветеност:	12 часа светлина: 12 часа тъмнина

▼ M6

	Интензитет	600 до 2 000 lux (измерен на повърхността на водата)
Температура на водата		22° ± 1 °C
pH		6,5—8,5.
Концентрация на разтворения кислород (DO)		> 3,5 mg/l (> 40 % стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух)
График за пробоземане за химични анализи		Веднъж седмично (4 пробоземания/изпитване)

▼ **M6**

Допълнение 2

Таблицы за протоколиране за необработени данни и обобщени данни

Таблица 1

Обща информация за изпитвания химикал

Информация за изпитвания химикал			
Въвеждат се изпитван химикал, мерни единици за концентрацията и третираня			
	Изпитван химикал:		
	Мерни единици за концентрацията:		
	Третиране 1		
	Третиране 2		
	Третиране 3		
	Третиране 4		
	Дата (ден 0)		Въведете дата (мм/дд/гг)
	Дата (ден 7)		Въведете дата (мм/дд/гг)
	Дата (ден 21)		Въведете дата (мм/дд/гг)

Таблица 2

Листове за събиране на необработени данни за дни 7 и 21

ДЕН X
ДАТА 00/00/00

	Концентрация	Номер на третирането	Номер на повторението	Индивидуален номер	Индивидуален идентификатор	Етап на развитие	SVL (дължина в mm)	Дължина на задни крайници (mm)	Мокро тегло на целия организъм (mg)
ROW	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							

▼ M6

	Концентрация	Номер на третирането	Номер на повторението	Индивидуален номер	Индивидуален идентификатор	Етап на развитие	SVL (дължина в mm)	Дължина на задни крайници (mm)	Мокро тегло на целия организъм (mg)
ROW	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							
33	0,00	2							

▼ M6

	Концентрация	Номер на третирането	Номер на повторението	Индивидуален номер	Индивидуален идентификатор	Етап на развитие	SVL (дължина в mm)	Дължина на задни крайници (mm)	Мокро тегло на целия организъм (mg)
ROW	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							

▼ M6

	Концентрация	Номер на третирането	Номер на повторението	Индивидуален номер	Индивидуален идентификатор	Етап на развитие	SVL (дължина в mm)	Дължина на задни крайници (mm)	Мокро тегло на целия организъм (mg)
ROW	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

▼ M6

Ден от изпитването	Дата	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Value!																
7	#Value!																
8	#Value!																
9	#Value!																
10	#Value!																
11	#Value!																
12	#Value!																
13	#Value!																
14	#Value!																
15	#Value!																
16	#Value!																
17	#Value!																
18	#Value!																
19	#Value!																
20	#Value!																
21	#Value!																
Брой в повторения		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Брой в третираня		0				0				0				0			

Забележка: Изчисленията в клетките са свързани с данните, въведени в таблица 1.

Таблица 5

Критерии за качеството на водата

Система на експозиция (проточна/статична с обновяване):

Температура:

Светлинен интензитет:

Цикъл светлина-тъмнина:

Храни:

Скорост на храненето:

pH на водата:

Концентрация на йод във водата за изпитване:

▼ M6

Таблица 6:

Обобщени химични данни

Химично наименование:																							
CAS №:																							
Ден от изпитването	Дата	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
0	00/00/00																						
1	#Value!																						
2	#Value!																						
3	#Value!																						
4	#Value!																						
5	#Value!																						
6	#Value!																						
7	#Value!																						
8	#Value!																						
9	#Value!																						
10	#Value!																						
11	#Value!																						
12	#Value!																						
13	#Value!																						
14	#Value!																						
15	#Value!																						
16	#Value!																						
17	#Value!																						
18	#Value!																						
19	#Value!																						
20	#Value!																						
21	#Value!																						

Забележка: Изчисленията в клетките са свързани с данните, въведени в таблица 1.

▼ M6

Таблица 8:

Допълнителни критерии за хистопатологията

Дата:

Химикал:

Патолог:

Контролен индивид ID — повторение 2	Контролен индивид ID — повторение 1		
		Увеличаване на областта на фоликуларния лумен	Намаляване на областта на фоликуларния лумен
Общо:			

Дозиран индивид ID — повторение 2	Дозиран индивид ID — повторение 1		
		Увеличаване на областта на фоликуларния лумен	Намаляване на областта на фоликуларния лумен
Общо:			

Дозиран индивид ID — повторение 2	Дозиран индивид ID — повторение 1		
		Увеличаване на областта на фоликуларния лумен	Намаляване на областта на фоликуларния лумен
Общо:			

Дозиран индивид ID — повторение 2	Дозиран индивид ID — повторение 1		
		Увеличаване на областта на фоликуларния лумен	Намаляване на областта на фоликуларния лумен
Общо:			

▼ M6

Таблица 9

Текстово описание на хистопатологичните находки

Дата:

Химикал:

Патолог:

Подробно описание

Контролен индивид ID — повторение 1		
Контролен индивид ID — повторение 2		
Дозиран индивид ID — повторение 1		
Дозиран индивид ID — повторение 2		

▼ M6

Дозирани индивид ID — повторение 1		
Дозирани индивид ID — повторение 2		

Дозирани индивид ID — повторение 1		
Дозирани индивид ID — повторение 2		

Таблица 10

Образец на таблица за протоколиране на обобщени данни за ден × (7 или 21) от ИМЗ

Крайна точка	Повторение	Контрола				Доза 1					Доза 2					Доза 3				
		Средна	SD	CV	N	Средна	SD	CV	N	р-стойност	Средна	SD	CV	N	р-стойност	Средна	SD	CV	N	р-стойност
Дължина на задни крайници Дължина (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Средна:																			
SVL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Средна:																			
Мокро тегло (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Средна:																			

Таблица 11

Образец на таблица за протоколиране на обобщени данни за ден x (7 или 21) данни от ИМЗ за етапа на развитие

	Повторение	Контрола				Доза 1					Доза 2					Доза 3				
		Медиана	Мин.	Макс.	N	Медиана	Мини-мална	Макс.	N	p-стойност	Медиана	Мин.	Макс.	N	p-стойност	Медиана	Мин.	Макс.	Медиана	p-стойност
Етап на развитие	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Средна:																			

▼ **M6***Допълнение 3***Алтернативен Анализ на тегло и дължина в случай на напреднал етап на развитие при над 20 % от поповите лъжички при една или повече от една концентрация**

Ако увеличен брой попови лъжички показват развитие след етап 60 ($\geq 20\%$) в една или повече от една номинална концентрация, тогава към всички попови лъжички следва да се приложи двуфакторен ANOVA с вложен дизайн за оценка на въздействията върху растежа, дължащи се на третирания с химикала, с едновременно отчитане на напредналия етап на развитие върху растежа.

Предложението е да се използват всички данни, но да се вземе предвид въздействието на напредналия етап на развитие. Това може да се постигне с помощта на двуфакторен ANOVA с вложен дизайн. За даден индивид се определя НапрЕтап = „Да“, ако неговият етап на развитие е равен на 61 или е по-голям. В противен случай се определя НапрЕтап = „Не“. След това може да бъде извършен двуфакторен ANOVA с концентрация и НапрЕтап и тяхното взаимодействие, с Повт(Конц) случаен фактор и Поповалъжичка(Повт) друго случайно въздействие. Това все още третира Повт като обект за анализ и дава по същество същите резултати като претегления анализ на средните на Повт*НапрЕтап, с тегло броят на животните в една средна. Ако данните не съответстват на изискванията на ANOVA за нормалност или хомогенност на дисперсията, тогава може да бъде направено преобразование за нормализация чрез подреждане по рангова скала за отстраняване на тази пречка.

В допълнение към стандартните ANOVA с използване на F-отношения за въздействието на Конц, НапрЕтап и техните взаимодействия, тестът с F-отношения за взаимодействието може да бъде „разделен“ на два допълнителни ANOVA с използване на F-отношения, единият третиращ средните стойности на отклиците при концентрациите за НапрЕтап = „Не“, а другият третиращ средните стойности на отклиците при концентрациите за НапрЕтап = „Да“. Последващите сравнения на средните при третиранията с тези при контролата се извършват в рамките на всяко ниво на НапрЕтап. Може да се извърши трендов анализ с използване на подходящи контрасти или обикновени сравнения по двойки, ако има доказателства за немонотонна зависимост доза-отклик в рамките на ниво на променлива от НапрЕтап. Корекция на Бонферони-Холм на р-стойностите се прави само ако съответният от двата „разделени“ допълнителни ANOVA F-теста не е значим. Това може да бъде извършено с помощта на SAS и, вероятно, на други статистически софтуерни пакети. Усложнения могат да възникнат, когато при някои концентрации няма индивиди в напреднал етап на развитие, но тези ситуации могат да бъдат третираны по ясен начин.

▼ M6

Допълнение 4

Определения

Химикал: Вещество или смес

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

▼ M6

B.39. ИЗПИТВАНЕ ЗА РАЗМНОЖАВАНЕ НА КОЛЕМБОЛИ В ПОЧВАТА

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 232 (2009). Настоящият метод за изпитване е предназначен за оценка на въздействието на химикали върху репродуктивната способност на колемболи в почвата. Той се основава на съществуващи процедури (1) (2). Видът *Folsomia candida* с партеногенетично размножаване и видът *Folsomia fimetaria* с полово размножаване са два от най-достъпните видове от разред Collembola, те също така могат да бъдат отглеждани и са достъпни в търговската мрежа. Когато трябва да бъдат оценявани определени местообитания, в които двата вида не се срещат, процедурата може да се разшири и към други видове от разред Collembola, ако с тях могат да бъдат изпълнени критериите за валидност на теста.
2. Обитаващите почвата колемболи са екологично значими видове за екотоксикологични изпитвания. Колемболите са шестокраки, с тънък екзоскелет, силно пропусклив по отношение на въздух и вода, и представляват видове от тип Членестоноги с начин и дози на експозиция, различни от тези на земните червеи и енхитреидите.
3. Гъстотата на популацията на Collembola обикновено достига до 10^5 m^{-2} в почвата и падналата листна маса в много сухоземни екосистеми (3) (4). Полово зрелите индивиди обикновено са с размери 0,5-5 mm, техният дял от общата биомаса и дишането на почвената фауна е малък, оценява се между 1 % и 5 % (5). Следователно тяхната най-важна роля може да бъде като потенциални регулатори на процесите чрез хранене с микроорганизми и хищничество по отношение на микрофауната. Колемболите са жертви за широк спектър от безгръбначни, живеещи под земята и по повърхността на земята, като например акари, стоножки, паяци, бръмбари от сем. Бегачи и късокрили бръмбари. Колемболите допринасят за процесите на разграждане в кисели почви, в които те могат да бъдат най-важните почвени безгръбначни освен енхитреидите, тъй като земни червеи и стоножки обикновено липсват.
4. *F. fimetaria* е разпространен в целия свят и се среща често в няколко вида почви, които варират от пясъкливи (рохкав пясък) до глинесто-пясъкливо-праховити и от алкални до кисели почви. Този вид колембола е непигментиран и без очи. Споменава се в селскостопански почви в цяла Европа (6). Всеяден е, като включва в храната си и гъбни хифи, бактерии, протозои и детрит. Чрез паша взаимодейства с инфекции на патогенни гъбички по растенията (7) и може да влияе на микоризата, както е известно за *F. candida*. Като повечето видове колемболи се размножава полово, изисквайки постоянно присъствие на мъжки за оплождането на яйцата.
5. *F. candida* също е разпространен в целия свят. Въпреки че не е обичаен за повечето естествени почви, той често е с много висока численост в богати на хумус почви. Този вид колембола е непигментиран и без очи. Има добре развита скакателна вилка (орган за скачане) и активни движения, свързани с бягане, и скача лесно, ако бъде обезпокоен. Екологичната роля на *F. candida* е сходна с ролята на *F. fimetaria*, но местообитанията са по-богати на органична материя почви. Тя възпроизвежда партеногенетично. Мъжките могат да се срещат в съотношение, по-малко от 1 на хиляда.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

6. Синхронни полово зрели (*F. fimetaria*) или ювенилни (*F. candida*) колемболи се експонират на диапазон от концентрации на изпитвания химикал, размесен в модифицирана изкуствена почва (8), с използване на 5 % съдържание на органична материя (или алтернативна почва). Сценарият на изпитването може да бъде разделен на две стъпки:

— изпитване за определяне на обхвата, в случай че не е налична достатъчно информация относно токсичността, като в него

▼ **M6**

смъртността и размножението са основните крайни точки, които се оценят след 2 седмици за *F. fimetaria* и 3 седмици за *F. candida*.

- Окончателно изпитване за размножаването, в което се оценяват общият брой на ювенилните индивиди, получени от родителски индивиди, и преживяването на родителските животни. Продължителността на това окончателно изпитване е 3 седмици за *F. fimetaria* или 4 седмици за *F. candida*.

Токсичното въздействие на изпитвания химикал върху смъртността при полово зрелите индивиди и върху репродуктивната способност се изразява като LC_x и EC_x чрез изглаждането на данните към подходящ модел на данните чрез нелинейна регресия, за да се оцени концентрацията, която би причинила съответно x % смъртност или намаляване на репродуктивната способност, или алтернативно като NOEC/LOEC стойност (9).

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНЯ ХИМИКАЛ

7. Предпочита се да са известни физичните свойства, разтворимостта във вода, $\log K_{ow}$, коефициентът на разпределение почва-вода и парното налягане на изпитвания химикал. Желателно е да е налична допълнителна информация относно съдбата на изпитвания химикал в почвата, като например скоростите на фотолизата, хидролизата и биотичното разграждане. Химичната идентификация на изпитвания химикал според номенклатурата на IUPAC, номер по CAS, партида, пратка, структурна формула и чистота следва да бъдат документирани, когато са налични.
8. Този метод за изпитване може да се използва за разтворими във вода и неразтворими химикали. Начините на прилагане на изпитвания химикал обаче съответно ще се различават. Методът за изпитване е неприложим за летливи химикали, т.е., химикали, за които константата на Хенри или коефициентът на разпределение въздух-вода е по-голям от единица, или за химикали, при които парното налягане превишава 0,0133 Pa при 25 °C.

ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

9. Следните критерии трябва да бъдат изпълнени при нетретирани контроли, за да се счита за валиден даден резултат от изпитването:
 - Средна смъртност сред полово зрелите индивиди не трябва да надвишава 20 % в края на изпитването;
 - Средният брой на ювенилните индивиди на съд следва да бъде най-малко 100 в края на изпитването;
 - Коефициентът на вариация, изчислен за броя на ювенилните индивиди, не трябва да е по-малък от 30 % в края на окончателното изпитване.

РЕФЕРЕНТЕН ХИМИКАЛ

10. Референтният химикал трябва да бъде изпитан при своята EC_{50} концентрация за избрания тип почва за изпитване — или на редовни интервали от време, или евентуално да бъде включен във всяко отделно провеждане на изпитване, за да се провери дали откликът на изпитваните организми в системата за изпитване е в рамките на нормалното равнище. Подходящ референтен химикал е борната киселина, която следва да намали размножаването с 50 % (10) (11) при около 100 mg/kg сухо тегло почва и за двата вида.

ОПИСАНИЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**Съдове и оборудване за изпитването**

11. Контейнери, в които може да бъде поставена 30 g влажна почва, са подходящи съдове за провеждане на изпитването. Материалът следва да бъде стъкло или инертна пластмаса (нетоксична). Независимо от това, използването на пластмасови контейнери следва да се избягва, ако експозицията на изпитвания химикал намалява поради сорбция. Съдовете за изпитването трябва да имат минимална площ на напречното

▼ **M6**

сечение, позволяваща действителната дълбочина на почвата в съдовете за изпитване да бъде 2-4 cm. Съдовете следва да са с прозрачни капаци (напр. стъкло или полиетилен), които са разработени така, че да намаляват изпаряването на водата, като същевременно дават възможност за газообмен между почвата и атмосферата. Контейнерът следва да бъде най-малко частично прозрачен, за да се позволи пропускането на светлина.

12. Необходимо е обикновено лабораторно оборудване, по-специално следното:

- сушилна камера;
- стереомикроскоп;
- рН-метър и луксметър;
- подходящи точни везни;
- подходящо оборудване за контрол на температурата;
- подходящо оборудване за контрол на влажността на въздуха (не е от съществено значение, ако съдовете за експозицията са покрити с капачки);
- инкубатор с контролирана температура или малко помещение;
- щипци или смукателно устройство със слаба тяга.

Приготвяне на почвата за изпитването

13. Използва се модифицирана изкуствена почва (8), с 5 % съдържание на органична материя. Като алтернатива може да се използва естествена почва, тъй като изкуствената почва не наподобява естествените почви. Препоръчителният състав на изкуствената почва е, както следва (на базата на сухо тегло, изсушена до постоянно тегло при температура 105 °C):

- 5 % торфен мъх, изсушен на въздух и фино смлян (размер на частиците от 2 ± 1 mm е приемливо);
- 20 % каолин (за предпочитане съдържанието на каолинит да е над 30 %);
- приблизително 74 % промишлен пясък, изсушен на въздух (в зависимост от количеството на необходимия CaCO_3), предимно фин пясък с над 50 % от частиците между 50 и 200 микрона. Точното количество пясък зависи от количеството на CaCO_3 (вж. по-долу), заедно те следва да доведат до 75 %.
- 1,0 % калциев карбонат (CaCO_3 на прах, с квалификация „чист“) за получаване на рН, равно на $6,0 \pm 0,5$; количеството на калциевия карбонат за добавяне може да зависи основно от качеството/естеството на торфа (вж. Забележка 1).

Забележка 1: Изискваното количество CaCO_3 ще зависи от съставките на почвения субстрат и следва да бъде определено чрез измерване на рН на предварително инкубирани влажни почвени подпроби непосредствено преди изпитването (14).

Забележка 2: Препоръчва се да се измерва рН и, по избор, съотношението C/N, катионообменният капацитет (СЕС) и съдържанието на органична материя в почвата, за да се даде възможност за нормализация на по-късен етап и за по-добро тълкуване на резултатите.

Забележка 3: Ако се изисква, например за конкретни цели на изпитвания, естествените почви от незамърсени източници също могат да бъдат използвани като субстрат за изпитванията и/или за отглеждане. Независимо от това, ако се използва естествена почва, тя следва да бъде характеризирана най-малко по отношение на произхода (място, от което е взета), рН, текстура (зърнометричен състав), СЕС и съдържание на органична материя и трябва да не съдържа никакво замърсяване. За естествените почви е препоръчително да се докаже тяхната годност за изпитване и за постигане на критериите за валидност на изпитването, преди използването на почвата в окончателно изпитване.

▼ **M6**

14. Сухите съставки на почвата се смесват старателно (напр. в голямо лабораторно устройство за смесване). Максималната способност за задържане на вода (СЗВ) на изкуствената почва се определя в съответствие с процедурите, описани в допълнение 5. Съдържанието на влага на почвата за изпитване следва да бъде оптимизирано, за да се постигнат сипкава пореста почвена структура, която дава възможност за навлизане на колемболите в порите. Това обикновено е между 40 и 60 % от максималната СЗВ.
15. Сухата изкуствена почва е предварително навлажнена в достатъчна степен чрез добавяне на дейонизирана вода, за получаване на приблизително половината от крайното съдържание на вода 2-7 дни преди започване на изпитването, за да се достигне равновесие при киселинността/да се стабилизира киселинността. За определянето на рН се използва смес от почва и разтвор на 1 М калиев хлорид (KCl) или 0,01 М калиев хлорид (CaCl₂) в съотношение 1:5 (съгласно допълнение 6). Ако почвата е по-киселинна от изисквания диапазон, може да бъде коригирана чрез добавяне на подходящо количество CaCO₃. Ако почвата е твърде алкална, може да се коригира чрез добавяне на неорганична киселина, която е безвредна за колемболите.
16. Предварително навлажнената почва се разделя на части, съответстващи на броя изпитвани концентрации (и референтен химикал, когато е целесъобразно) и контроли. Изпитваните химикали се добавят и съдържанието на вода се регулира съгласно точка 24.

Избор и приготвяне на изпитваните животински видове

17. Видът *Folsomia candida* с партеногенетично размножаване се препоръчва, тъй като по време на кръговото изпитване на метода за изпитване (11) при този вид критериите за валидност за преживяване са били изпълнени по-често, отколкото при *F. fimetaria*. Ако се използва друг вид, той следва да отговаря на критериите за валидност, посочени в точка 9. В началото на изпитването животните следва да бъдат добре нахранени и на възраст между 23-26 дни за *F. fimetaria* и 9-12 дни за *F. candida*. За всяко повторение броят на *F. fimetaria* следва да бъде 10 мъжки и 10 женски индивиди, а за *F. candida* трябва да бъдат използвани 10 женски (вж. допълнение 2 и допълнение 3). Синхронните индивиди се избират на случаен принцип от блюдата и тяхното здраве и физическо състояние се проверяват за всяка партида, която се добавя към повторение. Всяка група от 10/20 индивиди се добавя към случайно избран съд за изпитване и се избират големите женски от *F. fimetaria*, така че да гарантират правилното разграничаване от мъжките от *F. fimetaria*.

Приготвяне на концентрации за изпитване

18. Могат да се използват четири метода за прилагане на изпитвания химикал: 1) смесване на изпитвания химикал в почвата с вода като носител, 2) смесване на изпитвания химикал в почвата с органичен разтворител като носител, 3) смесване на изпитвания химикал в почвата с пясък като носител, или 4) прилагане на изпитвания химикал върху повърхността на почвата. Изборът на подходящ метод зависи от характеристиките на химикала и от целта на изпитването. Като цяло се препоръчва смесване на изпитвания химикал в почвата. Независимо от това, може да се изискват процедури на прилагане, които са в съответствие с практическата употреба на изпитвания химикал (например пръскане на течна формулировка или употреба на специфични пестицидни формулировки, като например гранули или продукти за третиране на семена). Почвата се третира преди добавянето на колемболите, дава се възможност на колемболите да навлезат в почвата, освен когато изпитваният химикал се добавя към повърхността на почвата.

Разтворим във вода изпитван химикал

19. Разтвор на изпитвания химикал се приготвя в дейонизирана вода в количество, достатъчно за всички повторения на една концентрация за изпитване. Всеки разтвор на изпитвания химикал се смесва грижливо с една партида предварително навлажнена почва, преди да бъде внесен в съда за изпитване.

Неразтворим във вода изпитван химикал

20. За неразтворимите във вода, но разтворими в органични разтворители химикали, изпитваният химикал може да бъде разтворен във възможно най-малкия обем подходящ носител (напр. ацетон), който все още

▼ **M6**

гарантира доброто размесване на химикала с почвата, и да бъде смесен с част от необходимия кварцов пясък. Следва да се използват само летливи разтворители. Когато се използва органичен разтворител, всички изпитвани концентрации и допълнителната отрицателна контрола на разтворител трябва да съдържат еднакво минимално количество от разтворителя. Контейнерите за прилагането трябва да се оставят непокрити за определен период от време, за да се даде възможност на разтворителя, свързан с прилагането на изпитвания химикал, да се изпари, като се гарантира неразпръскване на токсичния химикал през този период.

Изпитван химикал, малко разтворим във вода и органични разтворители

21. За малко разтворимите във вода и в органични разтворители химикали, кварцов пясък, който следва да е част от общото добавено в почвата количество пясък, се смесва с количеството изпитван химикал, 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, след добавяне на подходящо количество дейонизирана вода, за да се получи необходимото съдържание на влага. Крайната смес се разпределя между съдовете за изпитване. Процедурата се повтаря за всяка концентрация за изпитване, като се приготвя и подходяща контрола.

Прилагане на изпитвания химикал към повърхността на почвата

22. Когато изпитваният химикал е пестицид, може да е уместно същият да се прилага към повърхността на почвата чрез пръскане. Почвата се третира след добавянето на колемболите. Отначало изпитваните съдове се запълват с овлажнен почвен субстрат, след това се добавят индивидите, след което се претеглят изпитваните съдове. С цел да се избегне всякаква директна експозиция на индивидите на изпитвания химикал чрез пряк контакт, изпитваният химикал се прилага най-малко половин час след въвеждането на колемболите. Изпитваният химикал следва да се приложи към повърхността на почвата колкото се може по-равномерно, като се използва подходящо лабораторно устройство за пръскане с цел симулиране на прилагане чрез пръскане в полеви условия. Прилагането следва да се извършва при температура с вариране в рамките на ± 2 °C и, за водни разтвори, емулсии или дисперсии, с количество прилагана вода между 600 и 800 l/m² според препоръките от оценката на риска. Количеството следва да се проверява с използване на подходяща техника за калибриране. Специалните формулировки, като гранули или продукти за третиране на семена, могат да се прилагат по начин, съответстващ на използването им в селското стопанство. Храната се добавя след пръскането.

ПРОЦЕДУРА

Условия на изпитването

23. Средната температурата на изпитването следва да е 20 ± 1 °C с температурен диапазон 20 ± 2 °C. Изпитването се провежда при контролирани цикли светлина-тъмнина (за предпочитане 12 часа светлина и 12 часа тъмнина) с осветление от 400 до 800 lux в зоната на съдовете за изпитване.
24. С цел проверка на влажността на почвата, съдовете се претеглят в началото, в средата и в края на изпитването. Загуба на тегло > 2 % се компенсира чрез добавяне на дейонизирана вода. Следва да се отбележи, че загубата на вода може да се намали чрез поддържане на висока влажност на въздуха в инкубатора за изпитване (> 80 %).
25. Стойността на pH трябва да се измери в началото и в края както на изпитването за определяне на обхвата, така и на окончателното изпитване. Измерванията трябва да се извършват в една допълнителна контролна проба и една допълнителна проба от третирани почвени проби (всички концентрации), подготвени и поддържани по същия начин като изпитваните култури, но несъдържащи колемболи.

Процедура на изпитването и измервания

26. За всяка тествана концентрация за изпитване количество почва за изпитване, съответстващо на 30 g мокро тегло, се поставя в съда за изпитване. Приготвят се и контролите на вода, без изпитвания химикал.

▼ **M6**

- Ако за прилагане на изпитвания химикал се използва носител, една поредица контроли, съдържащи само носителя, следва да бъдат включени допълнително към изпитваните поредици. Концентрацията на разтворителя или на диспергиращото средство следва да е същата, като използваната в съдовете за изпитване, съдържащи изпитвания химикал.
27. Отделните колемболи внимателно се прехвърлят във всеки съд за изпитване (разпределени по изпитвателните съдове на случаен принцип) и се поставят върху повърхността на почвата. За ефикасно прехвърляне на животните може да се използва смукателно устройство със слаба тяга. Броят на повторенията за концентрациите за изпитване и за контролите зависи от използвания план за изпитването. Съдовете за изпитване се поставят в инкубатор за изпитване на случаен принцип и тези позиции се размятат веднъж седмично, също на случаен принцип.
 28. За изпитване на *F. fimetaria* броят им на съд за изпитване следва да бъде 10 мъжки и 10 женски индивида на възраст 23-26 дена. В ден 21 колемболите се извличат от почвата и се преброяват. При *F. fimetaria* полът се разпознава по размера в партидата от синхронизирани индивиди, използвана при изпитването. Женските индивиди са значително по-големи от мъжките (вж. допълнение 3)
 29. За изпитване на *F. candida* следва на съд за изпитване да се използват десет ювенилни индивида на възраст 9-12 дни. В ден 28 колемболите се извличат от почвата и се преброяват.
 30. Като подходящ източник на храна към всеки съд се добавя, в началото на теста и след около 2 седмици, достатъчно количество, например 2-10 mg гранулирана изсушена хлебна мая, достъпна в търговската мрежа и предназначена за домашна употреба.
 31. В края на изпитването се оценяват смъртността и размножаването. След 3 седмици (*F. fimetaria*) или 4 седмици (*F. candida*) колемболите се извличат от почвата за изпитване (вж. допълнение 4) и се преброяват (12). Дадена колембола се записва като мъртва, ако не е налична след извличането. Методът за извличане и преброяване следва да бъде валидиран. Валидността предполага по-голяма от 95 % ефикасност на извличането на ювенилни екземпляри, определяна например чрез добавяне на точно известен брой в почвата.
 32. Практично обобщение и график за провеждането на процедурата за изпитване са описани в приложение 2.

Планиране на изпитването*Изпитване за определяне на обхвата*

33. Когато е необходимо, се провежда изпитване за определяне на обхвата, например за пет концентрации на изпитвания химикал от 0,1, 1,0, 10, 100 и 1 000 mg/kg сухо тегло на почвата и две повторения за всяко третиране и контрола. Допълнителна информация върху смъртността или размножаването на *Collembola*, получена от изпитвания с аналогични химикали или от литературата, може също да бъде полезна при вземането на решение за диапазона на концентрациите, които да се използват при изпитването за определяне на обхвата.
34. Продължителността на изпитването за определяне на обхвата е две седмици за *F. fimetaria* и 3 седмици за *F. candida*, за да се гарантира, че са получени ювенилни екземпляри от едно люпило. В края на изпитването се оценяват смъртността и размножаването на *Collembola*. Броят на полово зрелите и срещането на ювенилни екземпляри трябва да бъдат записани.

Окончателно изпитване

35. За определяне на ЕС_x (напр. ЕС₁₀, ЕС₅₀) следва да се изпитат дванадесет концентрации. Препоръчват се най-малко две повторения за всяко третиране с концентрация на изпитване и шест контролни повторения. Кратността на разделянето може да варира в зависимост от зависимостта доза-отклик.

▼ **M6**

36. За определяне на NOEC/LOEC следва да се изпитат най-малко пет концентрации в геометрична прогресия. Препоръчват се четири повторения за всяко третиране с концентрация на изпитване, плюс осем контроли. Концентрациите трябва да бъдат разделени една от друга с кратност, която не превишава 1,8.
37. Комбиниран подход дава възможност за едновременно определяне на NOEC/LOEC и EC_x . За този комбиниран подход следва да бъдат използвани осем концентрации на третиране в геометрична прогресия. Препоръчват се четири повторения за всяко третиране, плюс осем контроли. Концентрациите трябва да бъдат разделени една от друга с кратност, която не превишава 1,8.
38. Ако при изпитването за определяне на обхвата не се наблюдават въздействия при най-високата концентрация (т.е. 1 000 mg/kg), изпитването за размножаването следва да бъде проведено като гранично изпитване, като се използват концентрация на изпитване от 1 000 mg/kg и контролата. Гранично изпитване ще предостави възможност да се демонстрира, че няма статистически значимо въздействие при предельната концентрация. По осем повторения следва да се използват както за третираната почва, така и за контролата.

ДАНИИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Обработка на резултатите**

39. Репродуктивната способност е основната крайна точка (напр. брой ювенилни екземпляри, получени на съд за изпитване). Статистическият анализ, напр. ANOVA процедури, сравнява третиранията с t-тест на Стюдънт, тест на Дънет или тест на Уйлямс. За индивидуалните средни от третиране се изчисляват доверителни интервали от 95 %.
40. Броят на преживелите полово зрели индивиди в нетретираните контроли е основен критерий за валидност и трябва да бъде документиран. Също както и при изпитването за определяне на обхвата, всички други признаци за неблагоприятно въздействие трябва да бъдат протоколирани и в окончателния протокол.

LC_x и EC_x

41. Стойностите на EC_x , включително свързаните с тях долни и горни 95 %-ни доверителни граници за параметъра, се изчисляват с помощта на подходящи статистически методи (например логистична функция или функция на Вейбул, метод на Спирмън-Карбър с изключване на данни, или обикновена интерполация). Стойност на EC_x се получава чрез добавяне на стойност, съответстваща на x % от средната стойност на контролна проба в уравнението. За изчисляване на EC_{50} или всяка друга стойност EC_x , пълният набор от данни (x) следва да бъде подложен на регресионен анализ. LC_{50} обикновено се оценява с пробит-анализ или подобен анализ, който отчита биномно разпределените данни за смъртността.

NOEC/LOEC

42. Ако със статистическия анализ се цели определяне на NOEC/LOEC, необходими са статистики за всеки отделен съд (индивидуалните съдове се разглеждат като повторения). Трябва да се използват подходящи статистически методи (съгласно документ на ОИСП № 54 „Съвременни подходи за статистически анализ на данни за екотоксичност: ръководство за прилагане“ (9)). По принцип неблагоприятните въздействия на изпитвания химикал в сравнение с контролата се проучват чрез тестване на едностранна хипотеза при $p \leq 0,05$.
43. Нормалното разпределение и хомогенността на дисперсията могат да бъдат тествани с помощта на подходящ статистически тест, напр. съответно тест на Шапиро-Уилк и тест на Левин ($p \leq 0,05$). Може да бъде извършен еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA) с

▼ **M6**

последващи множествени сравнения. За изчисляване дали са налице статистически значими разлики ($p \leq 0,05$) между контролите и различните концентрации на изпитвания химикал могат да се използват множествени сравнения (например тест на Дънет) или трендови тестове със стъпка назад (напр. тест на Уйлямс) (избор на препоръчителния тест в съответствие с документ № 54 на ОИСП (9)). В противен случай за определяне на NOEC и LOEC могат да се използват непараметрични методи (напр. U-тест на Бонферони по Holm или трендов тест на Йонкхере-Терпстра).

Гранично изпитване

44. Ако е извършено гранично изпитване (сравнение на контрола и само на едно третиране) и са изпълнени критериите за използване на параметрични тестови процедури (нормалност, хомогенност), метричните отклици могат да бъдат оценени чрез тест на Стюдънт (t-тест). Ако тези критерии не са изпълнени, може да се използва t-тест за нееднаква дисперсия (t-тест на Уелч) или непараметричен тест, напр. U-тест на Ман-Уитни.
45. За установяване на значими разлики между контролите (контрола и контрола на разтворител), повторенията на всяка контрола могат да се изпитват както е описано при граничното изпитване. Ако при тези изпитвания не бъдат установени значими разлики, всички повторения на контроли и контроли на разтворител могат да бъдат обединени. В противен случай всички третираня следва да бъдат сравнявани с контролата на разтворител.

Протокол от изпитването

46. Протоколът от изпитването следва да включва най-малко следната информация:

Изпитван химикал

- идентичността на изпитвания химикал, партида, пратка и номер по CAS, чистота;
- физични и химични свойства на изпитвания химикал (напр. $\log K_{ow}$, разтворимост във вода, парно налягане, константа на Хенри (H) и, за предпочитане, информация относно съдбата на изпитвания химикал в почвата), ако са налични;
- формулирането на изпитвания химикал и добавките следва да бъде уточнено, ако не се изпитва чистият химикал;

Изпитвани организми

- идентификация на животинския вид и доставчика на изпитваните организми, описание на условията за размножаване и възрастовия диапазон на изпитваните организми;

Условия на изпитването

- описание на плана на проучването и на процедурата;
- подробни данни за приготвянето на почвата за изпитване; подробна спецификация, ако се използва естествена почва (произход, история, зърнометричен състав, рН, съдържание на органична материя)
- способност на почвата за задържане на вода;
- описание на техниката, използвана за прилагане на изпитвания химикал към почвата;
- условия на изпитване: интензитет на светлината, продължителност на циклите светлина-тъмнина, температура;
- описание на режима на хранене, вида и количество на храната, използвана при изпитването, дати на хранене;
- стойност на рН и съдържание на вода в почвата в началото и в края на изпитването (контрола и всяко третиране);
- подробно описание на метода на извличане и на ефикасността на извличането;

▼ M6*Резултати от изпитването*

- броят на ювенилните екземпляри, определени във всеки от съдовете за изпитване в края на изпитването;
- броят на полово зрелите екземпляри и тяхната смъртност (%), във всеки от съдовете за изпитване в края на изпитването;
- описание на видими физиологични или патологични симптоми, или явни промени в поведението;
- резултатите, получени с референтния изпитван химикал;
- стойностите на NOEC/LOEC, LC_x за смъртността и EC_x за размножаването (най-вече за LC₅₀, LC₁₀, EC₅₀, и EC₁₀) заедно с доверителни интервали от 95 %. Графика на изгладения модел, използван за изчисляване, неговите функция и параметри (вж. (9));
- цялата информация и наблюдения, подпомагащи интерпретирането на резултатите;
- мощност на действителния тест, ако се използва проверка на хипотеза (9);
- отклонения от процедурите, описани в настоящия метод за изпитване, и всички необичайни обстоятелства по време на изпитването;
- валидност на изпитването;
- за NOEC — когато се изчислява — минималната откриваема разлика.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Wiles JA and Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester
- (2) ISO (1999) Soil Quality — Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. International Organisation for Standardisation, Geneva
- (3) Burges A and Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. London
- (4) Petersen H and Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388
- (5) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. *Acta Zoologica Fennica* 195: 111-118
- (6) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330pp (ISBN 0-19-854084-1)
- (7) Ulber B (1983) Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgium), 30 August-2 September 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268
- (8) Глава В.36 от настоящото приложение: Изпитване за размножаване на хищен акар (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) в почвата.
- (9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris
- (10) Scott-Fordsmann JJ and Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Danish Ministry for the Environment.

▼M6

- (11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 1256, pp. 66.
- (12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. *Appl. Soil Ecol.* 7, 201-205
- (13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.
- (14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In *Soil Zoology* (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, London, pp. 412-416
- (15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a note on the use of a fungistatic substance in the cultures. *Entomologists' Monthly Magazine* 96:138-140.

▼ M6*Допълнение 1***Определения**

В настоящия метод за изпитване са приложими следните определения (в настоящото изпитване всички ефективни концентрации се изразяват като масата на изпитвания химикал към сухата маса на почвата за изпитване):

Химикал означава вещество или смес.

Концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC) е концентрацията на изпитвания химикал, при която не се наблюдава въздействие. В настоящото изпитване концентрацията, съответстваща на NOEC, няма статистически значимо ($p < 0,05$) въздействие в рамките на даден период на експозиция, при сравнение с контролата.

ЛОЕС (най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект) е най-ниската концентрация на изпитвания химикал, при която е наблюдавано статистически значимо въздействие ($p < 0,05$) в рамките на даден период на експозиция, при сравнение с контролата.

ES_x (ефективна концентрация, при която се наблюдава x % от въздействието) е концентрацията, която причинява x % от дадено въздействие на изпитвани организми в рамките на даден период на експозиция, при сравнение с контрола. Например EC₅₀ е концентрация, за която е направена оценка, че предизвиква дадено въздействие върху изпитвана крайна точка в 50 % от експонираната популация в рамките на определен период на експозиция.

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

▼ M6

Допълнение 2

Основни действия и график за извършване на изпитването на колемболи

Етапите на изпитването могат да бъдат обобщени както следва:

Време (ден)	Действие
– 23 до – 26	Приготвяне на синхронна култура от <i>F. fimetaria</i>
– 14	Приготвяне на изкуствена почва (смесване на сухи съставки) Проверка на рН на изкуствена почва и съответно коригиране Измерване на максималната СЗВ на почвата
– 9 до – 12	Приготвяне на синхронна култура от <i>F. candida</i>
– 2 до – 7	Предварително навлажнена почва
– 1	Разпределяне на ювенилните екземпляри в партиди Приготвяне на изходни разтвори и прилагане на изпитвания химикал, ако се изисква разтворител
0	Приготвяне на изходни разтвори и прилагане на изпитвания химикал, ако се изисква прилагане на химикал в твърдо състояние, разтворим във вода или прилагане на повърхността. Измерване на рН на почвата и претегляне на контейнерите. Добавяне на храна. Въвеждане на колемболите.
14	Изпитване за определяне обхвата за <i>F. fimetaria</i> : Приключване на изпитването, извличане на животните, измерване на рН на почвата и на загубата на вода (тегло) Окончателни изпитвания: Измерване на съдържанието на влага и допълване на вода, и добавяне на 2-10 mg мая
21	Окончателно изпитване за <i>F. fimetaria</i> : Приключване на изпитването, извличане на животните, измерване на рН на почвата и на загубата на вода (тегло) Изпитване за определяне обхвата за <i>F. candida</i> : Приключване на изпитването, извличане на животните, измерване на рН на почвата и на загубата на вода (тегло)
28	Окончателно изпитване за <i>F. candida</i> : Приключване на изпитването, извличане на животните, измерване на рН на почвата и на загубата на вода (тегло)

▼ **M6**

Допълнение 3

Насоки за отглеждане и синхронизиране на *F. fimetaria* и *F. candida*

Времето и продължителността, дадени в това ръководство, следва да се проверяват за всеки конкретен шам, за да се гарантира, че графикът ще даде възможност за достатъчно на брой синхронизирани ювенилни екземпляри. По принцип яйцепологането, след прехвърлянето на полово зрелите индивиди на пресен субстрат, и излюпването на яйцата определят подходящия ден за събиране на яйца и за събиране на синхронни ювенилни екземпляри.

За препоръчване е да има постоянна изходна култура, състояща се например от 50 контейнера/блюда на Петри. Изходната култура следва да се захранва добре чрез ежеседмично хранене, добавяне на вода и отстраняване на хранителните остатъци и умрелите индивиди. Ако върху субстрата има прекалено малко колемболи, това може да доведе до потискане поради увеличено развитие на гъбички. Ако изходната култура се използва прекомерно често за получаване на яйца, в нея може да настъпи умора. Признаци на умора са мъртви възрастни индивиди и плесен върху субстрата. Яйцата, останали от получаването на синхронни индивиди, могат да се използват за подмладяване на културата.

В една синхронизирана култура на *F. fimetaria* мъжките индивиди се разграничават от женските предимно по размер. Мъжките са отчетливо по-малки от женските, и ходът на мъжките е по-бърз от този на женските. Правилният подбор на пола изисква малко практика и може да бъде потвърден с микроскопска инспекция на гениталната област (13).

1. Отглеждане**1.а. Приготвяне на субстрата за отглеждане**

Субстратът за отглеждане е парижки гипс (калциев сулфат) с активен въглен. Това осигурява влажен субстрат, като функцията на активния въглен е да абсорбира отпадъчните газове и екскрети (14) (15). За да се улеснят наблюденията над *Collembola* могат да се използват различни видове въглен. Например при *F. candida* и *F. fimetaria* се използва въглен на прах (получава се черен/сив парижки гипс):

Съставки на субстрата:

— 20 ml активен въглен

— 200 ml дестилирана вода

— 200 ml парижки гипс

или

— 50 g активен въглен на прах

— 260-300 ml дестилирана вода

— 400 g парижки гипс.

Сместа на субстрата се оставя да отлежи преди употреба.

1.б. Размножение

Колемболите се държат в контейнери, като например блюда на Петри (90 mm × 13 mm), с дъно, покрито със слой с дебелина 0,5 cm от субстрат гипс/въглен. Те се отглеждат при 20 ± 1 °C на цикъл светлина-тъмнина 12 на 12 часа (400-800 lux). Контейнерите се съхраняват влажни във всеки един момент, като така се гарантира, че относителната влажност на въздуха в контейнерите е 100 %. Това може да се гарантира от наличието на свободна вода в порестия гипс, но като се избягва получаването на воден слой върху повърхността на гипса.

▼ M6

Загубата на вода може да бъде предотвратена чрез осигуряване на влажен въздух от околната среда. Всички мъртви екземпляри трябва да се отстраняват от контейнерите, както и плесенясалата храна. За стимулиране на получаването на яйца е необходимо полово зрелите животни да бъдат прехвърлени в блюда на Петри с новоприготвен субстрат парижки гипс/въглен.

1.в. *Източник на храна*

Гранулираната сушена хлебна мая се използва като единствен източник на храна както за *F. candida*, така и за *F. fimetaria*. Прясна храна се предоставя веднъж или два пъти седмично, за да се избегне плесенясването. Постава се на купчинка непосредствено върху парижкия гипс. Масата на добавената хлебна мая следва да се регулира според размера на популацията от колемболи, но като общо правило са достатъчни 2-15 mg.

2. **Синхронизиране**

Изпитването трябва да се провежда със синхронизирани индивиди до получаване на хомогенни изпитвани животни от един и същ стадий и с еднакъв размер. Освен това, синхронизирането позволява разграничаването на мъжките от женските *F. fimetaria* от възраст 3 седмици и след това, въз основа на половия диморфизъм, т.е., разликите в размера. Процедурата по-долу е предложение за това как да бъдат получени синхронизирани индивиди (практическите стъпки са по избор).

2.а. *Синхронизиране.*

- Подготовка на контейнери с 0,5 cm слой субстрат парижки гипс/въглен.
- За излюпването на яйцата 150-200 полово зрели *F. fimetaria* и 50-100 *F. candida* се прехвърлят от най-добрите 15-20 контейнера с изходната култура със субстрат на възраст 4-8 седмици в контейнерите и се захранват с 15 mg хлебна мая. Избягва се поставянето на ювенилни екземпляри заедно с полово зрелите, тъй като присъствието на ювенилни екземпляри може да потисне получаването на яйца.
- Културата се държи при 20 ± 1 °C (средната стойност следва да е 20 °C) на цикъл светлина-тъмнина 12 на 12 часа (400-800 lux). Гарантира се, че има прясна храна на разположение и че въздухът е наситен с вода. Липсата на храна може да доведе до дефекация на животните върху яйцата, което води до развитие на гъбички върху яйцата, или *F. candida* може да изяде собствените си яйца. След 10 дни яйцата внимателно се събират с игла и шпатула и прехвърлят в „хартия за яйца“ (малки парчета филтърна хартия, наkisнатa в каша от парижки гипс/въглен), която се поставя в контейнер с пресен субстрат гипс/въглен. В субстрата се добавят няколко зрънца мая за привличане на ювенилните екземпляри, за да напуснат хартията за яйца. Важно е хартията за яйца и субстратът да са влажни, защото в противен случай яйцата се обезводняват. Като алтернатива, полово зрелите животни могат да бъдат отстранени от кутиите за синхронизиране на културата след получаването на яйца за 2 или 3 дни.
- След три дни повечето от яйцата върху хартията за яйца ще са излюпени, и някои ювенилни екземпляри могат да бъдат намерени под хартията за яйца.
- За да се получат ювенилни екземпляри с еднаква възраст, хартията за яйца с неизлюпените яйца се отстранява от блюдото на Петри с пинцети. Ювенилните екземпляри, към този момент на 0-3 дни, се оставят в блюдото и се захранват с хлебна мая. Неизлюпените яйца се изхвърлят.
- Яйцата и излюпените ювенилни екземпляри се отглеждат по същия начин, както полово зрелите индивиди. По-специално за *F. fimetaria* следва да се вземат следните мерки: осигуряване на достатъчно количество прясна храна, отстраняване на плесенясалата храна, след 1 седмица ювенилните екземпляри се разделят в нови блюда на Петри, при условие че гъстотата е над 200.

▼ **M6**2.6. *Боравене с колемболите при започването на изпитването*

- Екземплярите от *F. candida* на възраст 9-12 дни или от *F. fimetaria* на възраст 23-26 дни се събират, напр. чрез засмукване, и се поставят в малък контейнер с влажен субстрат гипс/въглен и тяхното физическо състояние се проверява с микроскоп (наранените и увредени екземпляри се премахват). Всички стъпки следва да се правят като същевременно атмосферата на колемболите се поддържа влажна, за да се избегне стрес от изсушаване, например чрез използване на навлажнени повърхности и т.н.
- Контейнерът се обръща с дъното нагоре и се почуква по него, за да се прехвърлят колемболите в почвата. Статичното електричество трябва да бъде неутрализирано, защото в противен случай е възможно животните само да летят във въздуха, или да се прилепят странично към контейнера за изпитването и да изсъхнат. За неутрализирането може да бъде използван йонизатор или влажна кърпа под контейнера.
- Храната следва да бъдат разпръсната по цялата повърхност на почвата, а не само в една бучка.
- По време на прехвърлянето и по време на периода на изпитване следва да се избягват почуквания или други действия, физически засягащи контейнерите за изпитване, тъй като това може да повиши уплътняването на почвата и да възпрепятства взаимодействието между колемболите.

3. **Алтернативни видове колемболи**

За изпитване в съответствие с настоящия метод за изпитване могат да бъдат избрани други видове колемболи, като например *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi*, *Mesaphorura macrochaeta*. Преди използването на алтернативни видове следва предварително да бъдат изпълнени редица предпоставки:

- Те следва да бъдат идентифицирани по категоричен начин;
- Следва да се направи обосновка на избора на вида.
- Следва да се гарантира, че репродуктивната биология е включена във фазата на изпитването, така че да бъде потенциален прицелен обект по време на експозицията;
- Следва да е известен жизненият цикъл: възраст при достигане на полова зрялост, продължителност на съзряване на яйцата и стадии, подлежащи на експозиция;
- Субстратът за изпитването и даването на храна трябва да предоставят оптимални условия за растежа и размножаването;
- Стойността на варирането следва да бъде достатъчно ниска за прецизна и точна оценка на токсичността.

▼ **M6***Допълнение 4***Извличане и броене на индивидите****1. Могат да бъдат използвани два метода на извличане.**

- 1.a. Първи метод: Може да се използва екстрактор с контролиран температурен градиент, основан на принципите на MacFadyen (1). Топлината идва от нагревателен елемент в горната част на клетката за извличане (регулиран чрез термистор, поставен върху повърхността на почвената проба). Температурата в охладената течност, заобикаляща съда за събирането, се регулира чрез термистор, разположен на повърхността на клетката за събиране (поставена под почвената среда). Термисторите са свързани към програмируем блок за управление, който повишава температурата съгласно предварително програмиран график. Екземплярите се събират в охладената клетка за събиране (2 °C) с дънен слой от парижки гипс/въглен. Извличането е с обща продължителност от 48 h, започва при 25 °C и температурата се увеличава автоматично с 5 °C на всеки 12 h. След 12 h при 40 °C извличането приключва.
- 1.б. Втори метод: След опитния инкубационен период броят на ювенилните екземпляри от *Collembola* се оценява чрез флотация. За тази цел изпитването се извършва в съдове с обем приблизително 250 ml. В края на изпитването се добавят около 200 ml дестилирана вода. Почвата се разбърква леко с фина четка, за да се позволи на колемболите да изплуват върху повърхността на водата. Малко количество, приблизително 0,5 ml черно фотографско багрило Kentmere, може да се добави към водата за подпомагане на броенето чрез увеличаване на контраста между водата и белите колемболи. Багрилото не е токсично за колемболи.

2. Преброяване:

Преброяването може да се извършва на око или под светлинен микроскоп, който използва мрежа, която се поставя върху съда за флотацията, или чрез фотографиране на повърхността на всеки съд и след това преброяване на колемболите върху увеличени разпечатани или прожектирани изображения. Преброяването може да се извършва също чрез използване на техники за цифрова обработка на изображения (12). Всички техники следва да са валидирани.

▼ M6

Допълнение 5

Определяне на максималната способност на почвата за задържане на вода

Следният метод за определяне на максималната способност на почвата за задържане на вода (СЗВ) се счита за подходящ. Той е описан в приложение В към ISO DIS 11268-2 (Качество на почвите — въздействия на замърсители върху земни червеи (*Eisenia fetida*). Част 2: Определяне на въздействията върху размножаването).

Взема се определено количество (например 5 g) изпитван почвен субстрат с помощта на подходящо устройство за пробовземане (шнекова сонда и т.н.). Дъното на сондата се покрива с парче влажна филтърна хартия и след това се поставя на стойка на водна баня. Сондата следва постепенно да се потапя във водата, докато водното ниво се издигне над повърхността на почвата. След това тя се оставя във водата за около три часа. Тъй като не цялото количество вода, абсорбирано от почвените капиляри, може да бъде задържано, почвената проба следва да се остави да се отцеди в продължение на два часа чрез поставяне на сондата върху легло от много влажен фино смлян кварцов пясък, намиращо се в покрит съд (за да се предотврати изсушаването). След това тази проба трябва да бъде претеглена и изсушена до постоянна маса при 105 °С. Способността за задържане на вода (СЗВ) трябва да се изчислява както следва:

$$\text{СЗВ(в \% от сухата маса)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

където:

S = водонаситен субстрат + маса на сондата + маса на филтърната хартия

T = тара (маса на сондата + маса на филтърната хартия)

D = сухата маса на субстрата

▼ M6*Допълнение 6***Определяне на стойността на рН на почвата**

Описаният по-долу метод за определяне на рН на почвата се основава на описанието в ISO DIS 10390: Качество на почвите — Определяне на рН.

Определено количество почва се изсушава при стайна температура в продължение на най-малко 12 часа. След това се приготвя суспензия от почвата, (съдържаща най-малко 5 грама почва) в нейния петкратен обем или в 1 М разтвор на калиев хлорид (KCl) с квалификация „чист“, или в 0,01 М разтвор на калциев хлорид (CaCl₂) с квалификация „чист“. След това суспензията се разклаща добре в продължение на пет минути и се оставя да се утаи в продължение на най-малко 2 часа, но не повече от 24 часа. След това се измерва стойността на рН на течната фаза с помощта на рН-метър, който е бил калибриран преди всяко измерване чрез подходящ набор от буферни разтвори (напр. рН 4,0 и 7,0).

▼ M6

В.40. ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ПРЕЗ ЦЕЛИЯ ЖИЗНЕН ЦИКЪЛ НА ХИРОНОМИДИ В СИСТЕМА ВОДА-СЕДИМЕНТ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА ВОДА С ДОБАВКА ИЛИ СЕДИМЕНТ С ДОБАВКА

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 233 (2010). Той е предназначен за оценка на въздействието на химикали от експозицията през целия жизнен цикъл на сладководното двукрило *Chironomus* sp. и обхваща изцяло 1-вото поколение (поколение P) и началото на 2-то поколение (поколение F1). Той представлява продължение на съществуващите методи за изпитване В.28 (1) и В.27 (15), като се използва сценарий на експозиция съответно на вода с добавка или на седимент с добавка. Методът също така взема под внимание съществуващите протоколи за изпитвания на токсичността за *Chironomus riparius* и *Chironomus dilutus* (с предходно наименование *C. tentans* (2)), разработени в Европа и Северна Америка (3)(4)(5)(6)(7)(8)(9) и впоследствие преминали през кръгово изпитване (1) (7) (10) (11) (12). Могат да се използват и други добре документирани видове хирономиди, напр. *Chironomus yoshimatsui* (13)(14). Цялостната продължителност на експозицията е около 44 дни за *C. riparius* и *C. yoshimatsui* и около 100 дни за *C. dilutus*.
2. В настоящия метод за изпитване са описани и двата сценария на експозиция — на вода и на седимент. 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 същият обхваща началната пикова стойност на концентрацията в повърхностните води. Сценарият с вода с добавка е полезен също и за други типове експозиция (в това число разливане на химикали), но не за процесите на натрупване в рамките на седимента, които продължават по-дълго от времетраенето на изпитването. В този случай, а също и когато оттичането е основен път за навлизането на пестициди във водни обекти, постановката със седимент с добавка може да е по-подходяща. Ако интерес представляват други сценарии на експозиция, планът на изпитването може да бъде лесно адаптиран. Например, ако разпределението на изпитвания химикал между водната фаза и слоя от седимент не представлява интерес и адсорбцията в седимента трябва да бъде сведена до минимум, може да бъде взето под внимание използването на сурогатен изкуствен седимент (напр. кварцов пясък).
3. Химикали, които изискват изпитване на обитаващите седимента организми, могат да се задържат в седимента в продължение на дълги периоди от време. Обитаващите 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 химикала. За силно адсорбиращите химикали или за химикали, 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 химикали, може да се разгледа възможността за добавяне на храна в седимента, преди да бъде приложен изпитваният химикал (вж. точка 31). Поради това е възможно да се включат всички пътища на експозиция и всички етапи от жизнения цикъл.
4. Измерваните крайни точки са общият брой на имагиниралите полово зрели индивиди (както за 1-во, така и за 2-ро поколение), скоростта на развитие (както за 1-во, така и за 2-ро поколение), съотношението между половете на имагиниралите и живите полово зрели индивиди (както за 1-во, така и за 2-ро поколение), броят на яйчните маси на женски индивид (само от 1-во поколение) и оплождането на яйчните маси (само от 1-во поколение).
5. Настоятелно се препоръчва формулиран седимент. Формулираният седимент има някои преимущества пред естествените седименти:

▼ **M6**

- намалява се варирането при опитите, тъй като формулираният седимент играе ролята на възпроизводима „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 сезонното вариране на включения в изпитването седимент, и без да се налага седиментът да се подлага на предварителна подготовка за отстраняване на собствената му фауна;
- по-ниски разходи в сравнение с тези за събирането в полеви условия на достатъчно количество седимент за рутинните изпитвания;
- формулираният седимент позволява сравняване на токсичността между изследванията и съответно ранжиране на химикалите (3).

6. Определенията, които са използвани, са дадени в допълнение 1.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

7. Ларви на хирономиди в първи ларвен стадий се експонират на диапазон от концентрации на изпитвания химикал в система седимент — вода. Изпитването започва с въвеждането на ларви в първи ларвен стадий (1-во поколение) в бехеровите чаши за изпитването, съдържащи седимент с добавка, или алтернативно, изпитваният химикал се добавя във водата след добавянето на ларвите. Оценяват се имагинирането на хирономидите, времето до имагинирането и съотношението между половете на напълно имагиниралите живи организми. Имагиниралите възрастни се прехвърлят в клетки за размножение, за улесняване на роенето, чифтосването и яйцепологането. Оценяват се броят на получените яйчни маси и тяхното оплождане. От тези яйчни маси се получават ларвите в първи ларвен стадий от 2-ро поколение. Тези ларви се поставят в наскоро приготвени изпитвателни бехерови чаши (процедура за добавяне както за 1-то поколение), за да се определи жизнеспособността на 2-рото поколение чрез оценка на имагинирането на хирономидите, времето до имагинирането и съотношението между половете на напълно имагиниралите живи организми (схематично представяне на изпитването за жизнения цикъл е дадено в допълнение 5). Всички данни се анализират или чрез регресионен модел, за да се оцени концентрацията, която би причинила x % намаляване в съответната крайна точка, или като се използва проверка на хипотези, за да се определи дадена концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC). Последното изисква сравнение на стойностите на отклиците от третирането с подходящите отклици при контролите, като се използват статистически тестове. Следва да се отбележи, че в сценария с вода с добавка, в случай на бързо разградиви химикали, по-късните етапи от живота на всеки етап на всяко поколение (напр. фаза на какавида) могат да бъдат експонирани на значително по-ниско равнище на концентрация във водата над седимента от ларвите от 1-ви ларвен стадий. Ако това е повод за загриженост, и е необходимо сравнимо ниво на експозиция за всеки от етапите на жизнения им цикъл, могат да се разгледат следните изменения на метода на изпитване:

- успоредни провеждания с добавяне при различни етапи на жизнения цикъл, или
- повторно добавяне (или обновяване на водата над седимента) на системата за изпитване по време на двете фази на изпитването (1-во и 2-ро поколение), при което интервалите на добавяне (обновяване) следва да бъдат съобразени с характеристиките на съдбата на изпитвания химикал.

Такива промени са осъществими само в рамките на сценария с вода с добавка, но не и в сценария със седимент с добавка.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНИЯ ХИМИКАЛ

8. Разтворимостта във вода на изпитвания химикал, неговото парно налягане и $\log K_{ow}$, 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 изпитвания химикал във водата над седимента, във водата между частиците на седимента и в седимента, с известни и протоколирани точност и граница на откриване. Ползвателната информация

▼ **M6**

включва структурната формула и чистотата на изпитвания химикал. Информацията за химичната съдба на изпитвания химикал (напр. разсейване, абиотично и биотично разграждане и т.н.) също е полезна. Допълнителни насоки за изпитване на химикали с физични и химични свойства, които ги правят трудни за изпитване, са дадени в (16).

РЕФЕРЕНТНИ ХИМИКАЛИ

9. Референтните химикали може да се изпитват периодично като средство за потвърждение, че чувствителността на популацията в лабораторията не е изменена. Както при водните бълхи, би било достатъчно да се извърши изпитване за 48-часова остра токсичност (по 17). Независимо от това, докато няма налична валидирана насока за остра токсичност, може да бъде взета предвид Глава В.28 от настоящото приложение. Могат да се посочат като пример следните референтни токсични вещества, използвани успешно в кръгови изпитвания и в изследвания за валидиране: линдан, трифлуоралин, пентахлорофенол, кадмиев хлорид и калиев хлорид (1) (3) (6) (7) (18).

ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

10. За да е валиден тестът, прилагат се следните условия:
- в края на експозицията и за двете поколения средното имагиниране в контролните третирувания трябва да бъде поне 70 % (1)(7);
 - за *C. riparius* и *C. yoshimatsui* 85 % от общия брой на имагиниралите полово зрели индивиди от контролното третиране при двете поколения трябва да се появяват между 12 и 23 дни след въвеждането на ларвите в първи ларвен стадий в съдовете; за *C. dilutus* е приемлив период от 20 до 65 дни;
 - средното съотношението между половете на имагиниралите и живи полово зрели индивиди (като дял женски или дял мъжки индивиди) в контролното третиране на двете поколения, следва да бъде най-малко 0,4, но не може да надвишава 0,6;
 - за всяка клетка за размножаване броят на яйчните маси в контролите от 1-вото поколение следва да бъде най-малко 0,6 на женски индивид, добавен към клетка за размножение;
 - делът на оплодените яйчни маси във всяка клетка за размножаване от контролите от 1-то поколение следва да бъде най-малко 0,6;
 - в края на периода на експозиция за двете поколения следва да се измери рН и концентрацията на разтворения кислород във всеки от съдовете. Концентрацията на разтворен кислород трябва да бъде поне 60 % от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух (ASV⁽¹⁾), а рН на водата над седимента следва да бъде в обхвата 6—9 във всички съдове за изпитване;
 - температурата на водата не трябва да варира с повече от ± 1 °C.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**Съдове за изпитване и клетки за размножение**

11. Ларвите се експонират в 600 ml стъклени бехерови чаши с диаметър около 8,5 cm (виж допълнение 5). 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 cm² на ларва. Съотношението между дебелината на слоя седимент и тази на водата над него трябва да бъде около 1:4. Следва да бъдат използвани клетки за размножаване (най-малко по 30 см във всяко от трите измерения) с

⁽¹⁾ При 20 °C и стандартно атмосферно налягане ASV в сладки води е равна на 9,1 mg/l (60 % означава 5,46 mg/l)

▼ M6

марля (размер на отвора приблизително 1 mm) в горната част и една странична част на клетката като минимум (вж. допълнение 5). Във всяка клетка се поставя за яйцеполагане блюдо кристализатор от 2 l, със съдържание на вода за изпитване и на седимент. Също така, за блюдото кристализатор съотношението между дебелината на слоя седимент и тази на водата над него трябва да бъде около 1:4. След като яйчните маси бъдат събрани от блюдото кристализатор, те се поставят в тигел на 12-гнездна микротигърна плака (една яйчна маса в гнездо, съдържаща минимум 2,5 ml вода от блюдото кристализатор с добавка), след което плаките се покриват с капак, за да се предотврати значимо изпаряване. Могат да се използват и други съдове, подходящи за съхранение на яйчните маси. С изключение на микротигърните плаки, всички съдове за изпитване и другото оборудване, което ще влезе в контакт с изпитваната система, следва да бъдат изцяло от стъкло или от друг химически инертен материал (напр. политетрафлуороетилен).

Избор на видове

12. За предпочитане е видът, който се използва за изпитването, да е *Chironomus riparius*. *C. yoshimatsui* също може да бъде използван. *C. dilutus* също е подходящ, но с него се борави по-трудно и е необходим по-дълъг период на изпитване. Подробности за методите на отглеждане на *Chironomus riparius* са дадени в допълнение 2. Информация за условията на отглеждане е на разположение също и за *C. dilutus* (5) и *C. yoshimatsui* (14). Идентичността на видовете трябва да се потвърждава преди изпитването, но не е задължителна преди всяко изпитване, ако организмите са получени при отглеждане в изпитващата лаборатория.

Седимент

13. За предпочитане е да се използва формулиран 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 ларвите на хириноидите, или да се хранят с тях. Също така се препоръчва преди изпитването седиментите да бъдат аклиматизиран в продължение на седем дни при условията на изпитването. Препоръчва се следният описан в (1) формулиран седимент (1) (20) (21):
- 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 μm);
 - г. добавя се дейонизирана вода, така че влажността на крайната смес да бъде в обхвата 30—50 %;
 - д. добавя се химически чист калциев карбонат (CaCO_3), 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 замърсяване с химикал (напр. тежки метали, органохлорни съединения,

▼ **M6**

органофосфорни съединения и т.н.). Пример за приготвянето на формулирания 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 аклиматизиран в необходимата степен.

Вода

15. Всяка вода, която отговаря на изброените в допълнение 2 и 4 химични характеристики за вода, приемлива за използване за разреждане, е подходяща за използване като вода за изпитването. Всяка подходяща вода, природна вода (от повърхностни или подпочвени води), възстановена вода (вж. допълнение 2) или дехлорирана чешмяна вода може да се използва за отглеждане и за изпитване, ако хириноmidите преживяват 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 CaCO₃. Ако обаче се предполага взаимодействие между отговорните за твърдостта йони и изпитвания химикал, 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.a. 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 изходен разтвор. Изходните разтвори се приготвят за предпочитане чрез разтваряне на изпитвания химикал във водата за изпитване. В някои случаи може да се наложи да се използват разтворители или диспергиращи средства, 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 средства могат да се използват Cremophor RH40, Tween 80, метилцелулоза 0,01 % и HCO-40. Концентрацията на средството за повишаване на разтворимостта в окончателната среда за изпитване следва да е минимална (т.е. ≤ 0,1 ml/l и трябва да бъде една и съща във всички третирания. Когато се използва средство за повишаване на разтворимостта, то не трябва да оказва значимо въздействие върху преживяването, което се вижда от контрола на разтворител в сравнение с отрицателна контрола (вода). Въпреки това, следва да се положат всички усилия, за да се избегне употребата на такива материали.

Изходни разтвори — седименти с добавка

- 16.b. Обикновено седиментите с добавка с избрана концентрация се приготвят чрез добавяне на разтвор на изпитвания химикал директно към седимента. Изходен разтвор на изпитвания химикал, разтворен в дейонизирана вода, се смесва с формулирания седимент с помощта на валцова мелница, смесител за фураж, или смесване с ръка. Ако е малко разтворим във вода, изпитваният химикал 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 разтваряне, диспергиране или емулгиране на изпитвания химикал могат да се използват само средства, които лесно се изпаряват. Трябва да се помни, че пясъкът, добавен заедно с изпитвания химикал, и пясъчната смес трябва да се вземат предвид при приготвянето на седимента (т.е., седиментът трябва следователно да се

▼ **M6**

приготвя с по-малко количество пясък). Трябва да се внимава изпитваният химикал, добавен към седимента, да бъде старателно и равномерно разпределен в целия му обем. Ако е необходимо, може да се анализират подпроби, за да се определи степента на хомогенност.

ПЛАНИРАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

17. Планирането на изпитването е свързано с избор на броя на стойностите на концентрацията на изпитване и интервалите между тези стойности, броя на съдовете за всяка концентрация, броя на ларвите във всеки съд, броя на блюдата кристализатори и клетките за размножение. По-долу са описани планове за ЕС_x, за NOEC и за провеждане на гранично изпитване.

Планиране на регресионния анализ

18. Ефективната концентрация (ЕС_x) и диапазонът от концентрации, над който въздействието на изпитвания химикал представлява интерес, следва да бъдат обхванати от изпитването, така че крайната точка да не се екстраполира извън обхвата на генерираните данни. Следва да се избягват екстраполации за стойности, много по-ниски от най-ниската концентрация или по-високи от най-високата концентрация. Предварително изпитване за определяне на обхвата в съответствие с методи за изпитване В.27 или В.28 може да е полезно при избора на подходящ диапазон от концентрации на изпитването.
19. За подход за ЕС_x следва да се извърши изпитване при най-малко пет концентрации и осем повторения за всяка концентрация. За всяка концентрация следва да се използват две клетки за размножаване (А и Б). Осемте повторения се разделят на две групи с по четири повторения за всяка клетка за размножаване. Това сливане на повторения е необходимо поради броя на индивидите, необходим в клетката, за надеждна оценка на размножаването. Независимо от това, за 2-то поколение отново има осем повторения, които започват от експонираните популации в клетките за размножаване. Кратността, с чиято помощ се получава следващата концентрация, не бива да бъде по-голяма от две (може да се направи изключение в случаите, в които графиката на зависимостта доза-отклик има твърде слаб наклон). Броят на повторенията за всяко третиране може да се намали до шест (три повторения за всяка клетка за размножение), ако се увеличи броят на изпитваните концентрации, които предизвикват различни отклици. Увеличаването на броя на повторенията или намаляването на кратността на интервалите между изпитваните концентрации обикновено води до стесняване на доверителния интервал около ЕС_x.

Планиране на изпитване за оценка на NOEC

20. За подход за NOEC следва да се извърши изпитване при пет концентрации и най-малко осем повторения (4 за всяка клетка за размножение, А и Б), а кратността между стойностите на концентрациите не бива да е по-голяма 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 % ($\alpha = 0,05$). По отношение на скоростта на развитие, плодовитостта и оплождането обикновено е подходящ дисперсионен анализ (ANOVA), последван тест на Дънет или тест на Уйлямс (22-25). За съотношението на имагиниране и съотношението между половете може да са подходящи тестът на Кокрън-Армитидж, точният тест на Фишер (с корекция на Бонферони) или тестът на Мантел-Хенцал.

Гранично изпитване

21. Може да се предприеме гранично изпитване (с една концентрация за изпитване и контрола(контроли)), ако не е наблюдавано въздействие в предварителното изпитване по избор за определяне на обхвата до максимална концентрация. Предназначението на граничното изпитване е да се покаже, че всякакво токсично въздействие на изпитвания химикал се открива на равнища, които са по-високи от изпитваната пределна концентрация. За вода се предлагат 100 mg/l, а за седимент — 1 000 mg/kg (сухо тегло). Обикновено са необходими

▼ **M6**

най-малко осем повторения както на третираните проби, така и на контролите. Следва да се докаже достатъчна статистическа мощност за откриване на разлика от 20 % по отношение на контролата при равнище на значимост от 5 % ($\alpha = 0,05$). По отношение на метричния отклик (например скорост на развитие), t-тестът е подходящ статистически метод, ако данните отговарят на изискванията на посочения тест (нормалност, хомогенни дисперсии). Ако посочените изисквания не са изпълнени, може да се използва t-тест за нееднаква дисперсия или непараметричен тест, напр. тест на Уилкоксън-Ман-Уитни. По отношение на съотношението на имагиниране е подходящ точният тест на Фишер.

ПРОЦЕДУРА**Условия на експозиция***Приготвяне на системата вода-седимент (вода с добавка)*

- 22.a. Подходящи количества формулиран седимент (вж. точки 13—14 и допълнение 3) се слагат във всеки съдове за изпитване и блюдо кристализатор, така че да се образува слой от най-малко 1,5 cm (за блюдото кристализатор може да е малко по-малко), но не повече от 3 cm. Добавя се вода (вж. точка 15) така, че съотношението между дебелината на слоя седимент и тази на водата да не надвишава 1:4. След подготовката на съдовете за изпитване системата седимент-вода трябва да се остави, при леко аериране, за около седем дни, преди да бъдат добавени ларвите в първи ларвен стадий от 1-вото или от 2-то поколение (вж. точка 14 и допълнение 3). Системата седимент-вода в блюдото кристализатори не се аерира по време на изпитването, тъй като не е необходимо тя да осигурява преживяване на ларви (преди излюпването яйчните маси вече са събрани). За да се избегне разделяне на съставките на седимента и повторно суспендиране на фините частици по време на добавянето на водата за изпитването във водата над седимента, седиментът може да се покрие с пластмасов диск, докато се налива водата. Дискът се отстранява незабавно след това. Могат да бъдат подходящи и други устройства.

Приготвяне на системата вода-седимент (седимент с добавка)

- 22.b. Седиментите с добавка, приготвени в съответствие с точка 16б, се поставят в съдовете и блюдото кристализатор и се добавя вода над седимента до получаване на обемно съотношение седимент-вода от 1:4. Дълбочината на слоя седимент трябва да бъде в интервала от 1,5 до 3 cm (тя може да бъде малко по-малка за блюдото кристализатор). За да се избегне разделяне на съставките на седимента и повторно суспендиране на фините частици по време на добавянето на водата за изпитването във водата над седимента, седиментът може да се покрие с пластмасов диск, докато се налива водата, веднага след което дискът трябва да се извади. Могат да бъдат подходящи и други устройства. След като е приготвен седиментът с добавка, заедно с водата над седимента, желателно е да се даде възможност изпитваният химикал от седимента да се разпредели в течната фаза (4)(5)(7)(18). За препоръчване е това да стане при температурата и аерирането, използвани при изпитването. Подходящото време за достигане на равновесие зависи от седимента и химикала и може да варира от няколко часа до дни, в редки случаи дори до пет седмици. Тъй като това би довело до разграждането на много химикали, не се чака достигане на равновесие, а се препоръчва период за уравнивяване, равен на 48 часа. Въпреки това, когато е известно, че времето на полуразграждане на химикала в седимента е дълго (вж. точка 8), времето за достигане на равновесие може да бъде удължено. В края на този допълнителен период за достигане на равновесие следва да се измери концентрацията на изпитвания химикал във водата над седимента, във водата между частиците на седимента и в седимента, най-малкото при най-високата и при пониска концентрация (вж. точка 38). Посочените аналитични определения на изпитвания химикал дават възможност за изчисляване на масовия баланс и изразяване на резултати въз основа на измерените концентрации.
23. Съдовете за изпитването следва да бъдат покрити (напр. със стъклени пластинки). Ако е необходимо, по време на изследването съдовете могат да се допълват до първоначалния обем, за да се компенсира изпаряването. Това следва да се извърши, като се използва дестилирана или дейонизирана вода, за да се избегне всякакво образуване

▼ M6

на соли. Блюдата кристализатори в клетките за размножаване не се покриват и при тях може, но не е задължително, да се извършва компенсация за загубата на вода по време на периода на изпитването, тъй като яйчните маси са в контакт с водата само за около един ден и блюдата за кристализиране се използват само в кратък етап от изпитването.

Добавяне на изпитваните организми

24. Четири до пет дни преди да бъдат добавени ларвите в първи ларвен стадий от 1-вото поколение, яйчните маси следва да се извадят от културата 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. Във всеки случай към средата за отглеждане се добавя малко количество храна, напр. няколко капки филтрат от суспензия от фино смляна храна за риби (вж. допълнение 2). Следва да се използват само прясно снесени яйчни маси. Като правило, ларвите започват да се излюпват няколко дни след снасянето на яйцата (2 до 3 дни за *Chironomus riparius* при 20 °C, 1 до 4 дни за *C. dilutus* при 23 °C и *C. 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 (максимум 48 h след излюпването). Стадият на развитие на ларвите може да се провери чрез проверка на широчината на капсулата на главата (7).
25. Двадесет ларви в първи ларвен стадий от 1-во поколение се разпределят на случаен принцип във всеки съд за изпитване, който съдържа система седимент-вода, като се използва пипета с тъп край. Аерирането на водата се спира при добавянето на ларвите в съдовете за изпитване и не се подновява преди изтичането на 24 часа след добавянето на ларвите (вж. точка 32). В зависимост от използвания план за изпитване (вж. точки 19 и 20) броят на ларвите, използвани за всяка концентрация, е най-малко 120 (6 повторения на концентрация) за подхода за ЕС_x и 160 за подхода за НОЕС (8 повторения на концентрация). При постановката със седимент с добавка експозицията започва с поставянето на ларвите.

Добавяне към водата над седимента

26. Двадесет и четири часа след добавянето на ларвите в първи ларвен стадий от 1-во поколение, изпитваният химикал се добавя във водата над седимента и отново се прилага леко аериране (за възможни изменения на планирането на изпитването вж. точка 7). Малки обеми от изходните разтвори на изпитвания химикал 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. В постановката с вода с добавка експозицията започва с добавянето на добавката към водата (т.е., един ден след добавянето на ларвите).

Събиране на имагиниралите полово зрели индивиди

27. Имагиниралите индивиди от 1-то поколение се събират поне веднъж, но за предпочитане два пъти дневно (вж. точка 36) от съдовете за изпитване с аспиратор, всмукателен вентилатор или подобно устройство (вж. допълнение 5). Трябва особено да се внимава полово зрелите индивиди да не бъдат увредени. Събраните индивиди от четири съда за изпитване в рамките на едно третиране се пускат в клетката за размножаване, към която те са били разпределени преди това. В деня на имагинирането на първия (мъжки) индивид в блюдата кристализатори се слага добавка чрез поставяне с пипета под водната повърхност на малък обем изходен разтвор на изпитвания химикал (постановка с вода с добавка). След това водата над седимента се разбърква леко, като се внимава седиментът да остане незасегнат. Концентрацията на изпитвания химикал в блюдото кристализатор номинално е същата, както в съдовете

▼ M6

за третиране, които са разпределени за тази конкретна клетка за размножаване. За постановката със седимент с добавка блюдата кристализатори се приготвят около ден 11 след началото на експозицията (т.е. въвеждането на ларвите от 1-то поколение), така че в тях да може да се достигне равновесие около 48 часа преди получаването на първите яйчни маси.

28. Яйчните маси се събират от блюдото кристализатор в клетката за размножаване с пинсета или пипета с тъп край. Всяка яйчна маса се поставя в съд, съдържащ среда за отглеждане от клетката за размножаване, от която тази яйчна маса е била събрана (напр. гнездо от 12-гнездна микроплака, заедно с най-малко 2,5 ml среда). Съдовете с яйчна маса се покриват с капак, за да се предотврати значимо изпаряване. Яйчните маси се държат за наблюдение в продължение на най-малко шест дни след като са били получени, така че да могат да се класифицират като оплодени или неоплодени.

За започване на 2-ро поколение от всяка клетка за размножаване се избират най-малко три, а за предпочитане шест оплодени яйчни маси, и заедно с малко храна им се дава възможност за излюпване. Тези яйчни маси трябва да са произведени по време на пиковата стойност на яйцепологането, която обикновено е около ден 19 от изпитването в контролите. В идеалния случай 2-рото поколение от всички третирания се започва на същия ден, но поради свързаните с химикала въздействия върху развитието на ларвите това може да не е винаги възможно. В такъв случай по-високата концентрация може да бъде започната по-късно от третираната на по-ниски концентрации и контролата (на разтворител).

- 29.a. При постановката с вода с добавка системата седимент-вода за 2-то поколение се приготвя чрез добавяне на изпитвания химикал във водата над седимента около 1 час преди добавянето на ларвите в първи ларвен стадий в съдовете за изпитване. Малки обеми от разтворите на изпитвания химикал 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. След добавянето се прилага леко аериране.
- 29.b. При постановката със седимент с добавка съдовете за изпитване, съдържащи системата седимент-вода за 2-то поколение се приготвят по същия начин, както за 1-то поколение.
30. Двадесет ларви в първи ларвен стадий (максимум 48 h след излюпването) от 2-ро поколение се разпределят на случаен принцип във всеки съд за изпитване, който съдържа системата седимент-вода с добавка, като се използва пипета с тъп край. Аерирането на водата трябва да се спре, когато ларвите в първи ларвен стадий се добавят в съдовете за изпитване, и да не се подновява преди изтичането на 24 часа след добавянето на ларвите. В зависимост от използвания план за изпитване (вж. точки 19 и 20) броят на ларвите, използвани за всяка концентрация, е най-малко 120 (6 повторения на концентрация) за подхода за ЕС_x и 160 за подхода за NOEC (8 повторения на концентрация).

Храна

31. Необходимо е да се хранят ларвите в съдовете за изпитване, 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) от 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg за *C. yoshimatsui*) на ларва на ден е достатъчно количество храна за млади ларви в първите 10 дни от тяхното развитие. За по-възрастни ларви може да е необходима малко повече храна: 0,5—1,0 mg на ларва на ден трябва да е достатъчно за оставащото време на изпитването. Дажбата храна във всички третирания и контролата следва да се намали, ако е забелязано развитие на гъбички, или ако в контролата има смъртност. Ако е невъзможно да се спре развитието на гъбички, изпитването трябва да се повтори.

Токсикологичната значимост на експозицията чрез поглъщане обикновено е по-висока при химикали с висок афинитет към органичен

▼ M6

въглерод или при химикали, образуващи ковалентна връзка със седимента. Следователно, когато се изпитват химикали с такива свойства, количеството храна, необходимо за гарантиране на преживяването и нормалното развитие на ларвите, може да се добави към формулацията на седимент преди периода на стабилизация, в зависимост от регулаторните нужди. За да се предотврати влошаването на качеството на водата, 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). Добавянето в седимента на цялата дажба от даден органичен източник на храна преди поставянето на добавката нито е обичайно, предвид качеството на водата и биологичните показатели (21), нито е стандартизиран метод, но нови изследвания сочат, че този метод функционира (19) (26). Полово зрелите индивиди в клетката за размножаване обикновено не се нуждаят от храна, но плодовитостта и оплождането се подобряват, когато на имагиниралите полово зрели индивиди бъде предложен като храна наситен разтвор на захароза, напоен в тампон от памук (34).

Условия за инкубиране

32. Водата над седимента в съдовете за изпитване леко се аерира 24 часа след добавянето на ларвите в първи ларвен стадий от двете поколения, 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“, чийто отвор е закрепен на 2—3 cm над слоя седимент, с няколко мехурчета в секунда. Когато се изпитват летливи химикали, следва да се разгледа възможността да не се аерира системата седимент-вода, като същевременно критериите за валидност за минимум 60 % от ASV (точка 10) трябва да бъдат изпълнени. Повече подробна информация е предоставена в (16).
33. Изпитването с *C. riparius* се провежда при постоянна температура 20 °C (± 2 °C). Препоръчаните за *C. dilutus* и *C. yoshimatsui* температури са съответно 23 °C и 25 °C (± 2 °C). Продължителността на излагане на светлина е 16 часа, а интензитетът на светлината трябва да бъде между 500 и 1 000 lux. По отношение на клетките за размножаване може да бъде включена допълнителна фаза от един час разсъмване и здрач.

Продължителност на експозицията

34. Постановка с вода с добавка: периодът на експозиция на 1-то поколение започва, когато изпитваният химикал се добавя във водата над седимента в съдовете за изпитване (което е един ден след въвеждането на ларвите — за възможни изменения на плана за експозицията вж. точка 7). Експозицията на 2-рото поколение ларви започва незабавно, тъй като те са въведени в система седимент-вода, в която вече има добавка. Максималната продължителност на експозицията за 1-то поколение е 27 дни и 28 дни за 2-то поколение (1-вото поколение ларви прекарва един ден в съдовете без експозиция) за *C. riparius* и *C. yoshimatsui*. Като се има предвид припокриването, пълната продължителност на изпитването е около 44 дни. За *C. dilutus* максималните продължителности на експозицията са 64 и 65 дни, съответно за 1-вото и за 2-рото поколение. Общата продължителност е около 100 дни.

Постановка със седимент с добавка: експозицията започва с поставянето на ларвите и е максимум 28 дни за двете поколения за *C. riparius* и *C. yoshimatsui* и максимум 65 дни за двете поколения за *C. dilutus*.

Наблюдения*Имагиниране*

35. За двете поколения се определя времето на развитие и общият брой на напълно имагинирани и живи мъжки и женски индивиди. Мъжките лесно се разпознават по перестите си антени и слабо телосложение.

▼ M6

36. Съдовете за изпитване с двете поколения се наблюдават най-малко три пъти седмично, за да се оцени визуално дали не е налично ненормално по отношение на контролите поведение на ларвите (напр. напускане на седимента, необичайно плуване). По време на периода на имагиниране, който започва около 12 дни след въвеждането на ларвите за *C. riparius* и *C. yoshimatsui* (20 дни за *C. dilutus*), имагиниралите индивиди се броят и и определят по пол поне веднъж, но за предпочитане два пъти дневно (рано сутринта и късно следобед). След разпознаването индивидите от 1-то поколение внимателно се отстраняват от съдовете и се прехвърлят в клетка за размножаване. След разпознаването на индивидите от 2-то поколение, същите се отстраняват и умъртвяват. Всички яйчни маси, положени в съдовете за изпитване от 1-то поколение, следва да бъдат събирани индивидуално и прехвърляни с най-малко 2,5 ml от водата, от която са събрани, върху 12-гнездови микроплаки (или други подходящи съдове), които са покрити с капак, за да се предотврати значимо изпаряване. Броят на умрелите ларви и видимите какавиди, които не са успели да имагинират, също следва да се записва. Примери за клетка за размножение, съд за изпитване и всмукателен вентилатор са дадени в допълнение 5.

Размножаване

37. Въздействията върху размножаването се оценяват чрез броя на яйчните маси, получени от 1-то поколение индивиди, и от оплождането на тези яйчни маси. Веднъж дневно яйчните маси се събират от блюдото кристализатор, което е поставено във всяка клетка за размножаване. Яйчните маси следва да се събират и прехвърлят с най-малко 2,5 ml от водата, от която са събрани, в 12-гнездова микроплака (една яйчна маса във всяко гнездо) или в други подходящи съдове, които са покрити с капак, за да се предотврати значимо изпаряване. За всяка яйчна маса се документират следните характеристики: дата на получаване, размер (нормална, т.е. $1,0 \pm 0,3$ cm, или малка; обикновено $\leq 0,5$ cm), структура (нормална = във форма на банан със спираловидни низове от яйца, или необичайна, напр. низ от яйца, който не е със спираловидна форма) и оплождане (оплодена или неоплодена). Оплождането на яйчната маса се оценява в рамките на шест дни след като е била получена. Яйчната маса се счита за оплодена, когато най-малко една трета от яйцата се излюпят. Общият брой на женските индивиди, добавени към клетката за размножение, се използва, за да се изчислят броят на яйчните маси на женски индивид и броят на оплодените яйчни маси на женски индивид. Ако се изисква, броят на яйцата в яйчната маса може да бъде оценен, без да се нарушава целостта им, с използване на метод с пръстени (подробно описан в 32 и 33).

Аналитични измервания*Концентрация на изпитвания химикал*

38. Като минимум следва да се анализират проби от водата над седимента, от водата между частиците на седимента и от седимента в началото на експозицията (при вода с добавка за предпочитане е един час след прилагането) и в края на изпитването при най-високата концентрация и при по-ниска такава. Това се прилага за съдове както с едното, така и с другото поколение. От блюдата кристализатори в клетката за размножаване се анализира само водата над седимента, тъй като именно тя влиза в контакт с яйчните маси (за постановката със седимент с добавка може да бъде взето предвид аналитично потвърждаване на седиментната концентрация). Ако се сметне за необходимо, по време на изпитването могат да се проведат допълнителни измервания на седимента, водата между частиците на седимента и водата над седимента. Посочените определяния на концентрацията на изпитвания химикал дават информация за поведението/разпределението на изпитвания химикал в системата вода-седимент. За вземането на проби от седимента и водата между частиците на седимента при започване и по време на

▼ **M6**

изпитването (вж. точка 39) се изискват допълнителни съдове за изпитване за извършване на аналитичното определяне. Измерванията в седимента при постановка с вода с добавка може да не са необходими, ако разпределението на изпитвания химикал между водата и седимента е ясно определено с изследване вода/седимент при сходни условия (напр. съотношение на седимента към водата, вид на прилагането, съдържание на органичен въглерод на седимента), или ако измерените концентрации във водата над седимента остават със стойности от 80 до 120 % от номиналната или измерената начална концентрация.

39. Когато се правят междинни измервания (напр. на 7-ия и/или 14-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 третираны по същия начин (включително присъствието на организми за изпитването), но които не се използват за биологични наблюдения.
40. За изолиране на интерстициалната вода (= водата между частиците на седимента) се препоръчва центрофугиране при 10 000 g и 4 °C за 30 min. Ако обаче се покаже, че изпитваният химикал не се адсорбира от филтрите, филтруването също е приемливо. В някои случаи може да не е възможно да се анализират концентрациите във водата между частиците на седимента, тъй като пробата може да е с много малък размер.

Физични и химични параметри

41. Стойността на рН, концентрацията на разтворения кислород във водата за изпитване и температурата на водата в съдовете за изпитване и блюдата кристализатори следва да се измерват по подходящ начин (вж. точка 10). Твърдостта и амониякът се измерват в контролните съдове и в един съд за изпитване и едно блюдо кристализатор при най-високата концентрация в началото и в края на изпитването.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Обработка на резултатите**

42. Целта на настоящото изпитване за целия жизнен цикъл е да се определи въздействието на изпитвания химикал върху размножаването и, за две поколения, върху скоростта на развитие и общия брой на напълно имагиниралите и живи мъжки и женски индивиди. Данните за съотношението на имагиниране на мъжките и женските индивиди следва да бъдат обединени. Ако не съществуват статистически значими разлики между чувствителността в скоростта на развитие на различните полове, резултатите за мъжките и женските индивиди могат да се обединят за целите на статистическия анализ.
43. Концентрациите, оказващи въздействие, изразени като концентрации във водата над седимента (за вода с добавка), обикновено се изчисляват въз основа на измерените концентрации в началото на експозицията (вж. точка 38). Поради това за водата с добавка концентрациите, обикновено измервани в началото на периода на експозиция във водата над седимента в съдовете и за двете поколения, и концентрациите в блюдата кристализатори, се осредняват за всяко третиране. За седимента с добавка концентрациите, обикновено измервани в началото на периода на експозиция в съдовете и за двете поколения (и по избор концентрациите в блюдата кристализатори), се осредняват за всяко третиране.
44. За да се изчисли точкова оценка, т.е., ES_x , статистиките на съд и на клетка за размножаване могат да се използват като истински повторения. При изчисляването на доверителния интервал за всяка стойност на ES_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 изгладен 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 на ES_x обаче следва да се изчисляват след като откликът е обратно трансформиран към оригиналната стойност (31).

▼ **M6**

45. Когато със статистическия анализ се цели определяне на NOEC чрез проверка на хипотези, варирането между съдовете трябва да се взема под внимание, което се гарантира чрез използване на ANOVA методи (примерно процедури на теста на Уйлямс или теста на Дънет). Използването на теста на Уйлямс би било целесъобразно, когато теоретично се очаква монотонна зависимост доза-отклик, докато тестът на Дънет би бил целесъобразен там, където не се потвърждава хипотезата за монотонността. Като алтернатива, при ситуации, в които са налице нарушения на обичайните допускания на ANOVA, може да се окажат полезни по-устойчиви тестове (27).

Съотношение на имагиниране

46. Стойностите на съотношението на имагиниране (ER) са двоични данни и могат да се анализират с теста на Кокрън-Армитидж, който се прилага със стъпка назад, когато се очаква монотонна зависимост доза-отклик, а тези данни потвърждават очакванията. В противен случай може да се използва точният тест на Фишер или тестът на Мантел-Хенцал с коригирани по Бонферони-Холм р-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), следва да се прилага устойчив тест на Кокрън-Армитидж или точен тест на Фишер, както се предлага в (27).

Сборът от имагиниралите индивиди (мъжки плюс женски) 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 имагиниралите индивиди на съд

n_a = брой на въведените ларви на съд (обикновено 20)

Когато n_e е по-голям от n_a (т.е. когато непреднамерено е въведен повече от предвидения брой ларви) n_a следва да бъде приравнен към n_e .

47. Алтернативен подход, който е най-пригоден за големи извадки, когато е налице екстра биномна дисперсия, е да се третира съотношението на имагиниране като непрекъснат отклик и да се използват процедури, съответстващи на тези данни за ER. Като голяма извадка тук се определя такава, при която броят както на имагиниралите, така и на неимагиниралите индивиди, надвишава пет за всяко повторение (съд).
48. За да се приложат методите на ANOVA, стойностите на ER трябва първо да се преобразуват с трансформация „аркусинус от корен квадратен“ или с трансформация на Тюки-Фрийман, за да се получи приблизително нормално разпределение и да се изравнят дисперсиите. При използване на абсолютни честоти може да се приложи тестът на Кокрън-Армитидж, точният тест на Фишер (Бонферони), или тестът на Мантел-Хенцал. Трансформацията „аркусинус от корен квадратен“ се прилага, като се вземе реципрочната стойност на синус (\sin^{-1}) от квадратния корен на ER.
49. Стойностите ES_x за съотношението на имагиниране се изчисляват с помощта на регресионен анализ (напр. пробит-модел, логит-модел или модел на Вейбул (28)). Ако регресионният анализ е неуспешен (напр. ако има по-малко от два частични отклика), могат да се използват други непараметрични методи, напр. хлъзгачи се средни или обикновена интерполация.

Скорост на развитие

50. Средното време на развитие е средният период между въвеждането на ларвите (ден 0 на изпитването) и имагинирането на опитната кохорта от индивиди (за изчисляването на действителното време за

▼ M6

развитие следва да бъде взета предвид възрастта на ларвите в момента на въвеждането). Скоростта на развитие (единица: 1/ден) е реципрочна на времето на развитие и отговаря на частта от развитието на ларвите, която се извършва за един ден. Скоростта на развитие се предпочита за 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 помощни параметрични тестови процедури, в които се използва скоростта на развитие, за разлика от времето за развитие. По отношение на скоростта на развитие като непрекъснат отклик, стойностите на EC_x могат да се оценят с използване на регресионен анализ (напр. (29) (30)). NOEC за средна скорост на развитие може да се определи чрез ANOVA методи, напр. тестове на Уйлямс или на Дънет. Тъй като мъжките имажинират по-рано от женските, т.е. имат по-висока скорост на развитие, има смисъл да се изчислява скоростта на развитие за всеки пол поотделно, в допълнение към общата стойност за всички индивиди.

51. За статистическото тестване се допуска, че наблюдаваният в ден „x“ за инспекция брой индивиди са имажинирали в средата на интервала между ден x и ден x - 1 (l = дължина на периода на инспекция, обикновено 1 ден). Средната скорост на развитие за съд (\bar{x}) се изчислява по формулата:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i X_i}{n_e}$$

където:

\bar{x} : средна скорост на развитие за съд

i: индекс на периода на инспекция

m: максимален брой интервали на инспекция

f_i : брой на имажиниралите индивиди през периода на инспекция i

n_e : общ брой на имажиниралите индивиди в края на експеримента (= $\sum f_i$)

x_i : скорост на развитие на имажиниралите индивиди в интервала на инспекция i

$$x_i = 1/\text{day}_i - \frac{l_i}{2}$$

където:

ден_i: ден на инспекция (дни след въвеждането на ларвите)

l_i : продължителност на интервала i (дни, обикновено 1 ден)

Съотношение между половете;

52. Съотношенията между половете са двоични данни и следва да бъдат оценени с помощта на точен тест на Фишер или други подходящи методи. Естественото съотношение между половете при *C. riparius* е единица, т.е. мъжките и женските са с еднакво обилие. Данните за съотношението между половете следва да бъдат третираны по един и същ начин и за двете поколения. Тъй като максималният брой индивиди за съд (т.е. 20) е твърде нисък за съдържателен статистически анализ, общият брой на напълно имажинирали и живи

▼ **M6**

индивиди за всеки пол се сумира за всички съдове на едно третиране. Тези нетрансформирани данни се тестват по отношение на контролата (на разтворител) или на обединените данни от контролите в таблица на спрегнатост 2×2 .

Размножение

53. Размножението се изчислява като плодовитост чрез броя на яйчните маси на женски индивид. По-конкретно, общият брой на яйчните маси, получени в дадена клетка за размножение, се разделя на общия брой на живи и неувредени женски индивиди, добавени в тази клетка. NOEC за плодовитостта може да се определи чрез ANOVA методи, напр. тестове на Уйлямс или на Дънет.
54. Оплождането на яйчните маси се използва за количествено определяне на оплодените яйчни маси на женски индивид. Общият брой на оплодените яйчни маси, получени в дадена клетка за размножение, се разделя на общия брой на живи и неувредени женски индивиди, добавени в тази клетка. NOEC за оплождането може да се определи чрез ANOVA методи, напр. тестове на Уйлямс или на Дънет.

Протокол от изпитването

55. Докладът от изпитването следва да предоставя следната информация:

Изпитван химикал:

- физична природа, физични и химични свойства (разтворимост във вода, парно налягане, $\log K_{ow}$, коефициент на разпределение в почва (или в седимент, ако такава информация е налице), стабилност във вода, в седимент 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 изпитвания химикал.

Изпитвани видове:

- използвани в изпитването организми: вид, научно наименование, източник на организмите и условия на отглеждане;
- информация за начина на боравене с яйчните маси и ларвите;
- Информация относно обработката на имагиниралите полово зрели индивиди от 1-то поколение с помощта на всмукателен вентилатор и др. (вж. допълнение 5)
- възраст на изпитваните организми по време на въвеждането на 1-то и 2-то поколение в съдовете за изпитване.

Условия на изпитването:

- използван седимент, т.е., естествен или формулиран (изкуствен) седимент;
- естествен седимент: местоположение и описание на мястото на вземане на седимента, включително (ако е възможно) история на замърсяване; характеристики на седимента: рН, съдържание на органичен въглерод, съотношение C/N и зърнометричен състав (ако е подходящо).
- формулиран седимент: приготвяне, съставки и характеристики (съдържание на органичен въглерод, рН, влажност, и т.н., измерени в началото на изпитването);
- подготовка на водата за изпитването (ако се използва възстановена вода) и характеристики на водата (концентрация на кислород, рН, твърдост и т.н., измерени в началото на изпитването);

▼ **M6**

- дълбочина на седимента и на водата над седимента в съдовете за изпитване и блюдата кристализатори;
- обем на водата над седимента и на водата между частиците на седимента; тегло на мокър седимент със и без водата между частиците на седимента за съдовете за изпитване и блюдата кристализатори;
- съдове за изпитване (материал и размери);
- блюда кристализатори (материал и размери);
- клетки за размножаване (материал и размери)
- метод за приготвяне на изходни разтвори и на концентрации за изпитване за съдовете за изпитване и за блюдата кристализатори;
- прилагане на изпитвания химикал в съдовете за изпитване и блюдата кристализатори: концентрации за изпитване, брой на повторенията и разтворители, ако са необходими;
- условия за инкубация за съдовете за изпитване: температура, редуване на светлина и тъмнина, светлинен интензитет, аериране (мехурчета в секунда);
- условия за инкубация за клетките за размножаване и за блюдата кристализатори: температура, редуване на светлина и тъмнина, светлинен интензитет;
- условия за инкубация за яйчните маси в микроплаките (или други съдове): температура, редуване на светлина и тъмнина, светлинен 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 изпитвания химикал в съдовете за изпитване;
- качество на водата в съдовете за изпитване и блюдата кристализатори, т.е., рН, температура, разтворен кислород, твърдост и амоняк;
- замяна на изпарилата се вода от изпитването за съдовете за изпитване, ако има такава;
- брой на имагиниралите мъжки и женски индивиди за съд и за ден от 1-вото и от 2-то поколение;
- съотношение между половете на напълно имагиниралите и живи индивиди на третиране за 1-вото и 2-то поколение
- брой ларви, недостигнали до стадий на имаго за съд за 1-вото и 2-то поколение;
- процент/дял на имагиниране на повторение и на концентрация за изпитване (обединени мъжки и женски индивиди) за 1-вото и 2-то поколение;
- средна скорост на развитие на напълно имагиниралите и живи индивиди на повторение и на концентрация на третиране (мъжки и женски индивиди както поотделно, така и обединени) за 1-вото и 2-то поколение;
- брой на яйчните маси, положени в блюдата кристализатори на клетка за съответните клетка за размножаване и ден;

▼ M6

- характеристики на всяка яйчна маса (размер, форма и оплождане);
- Плодовитост — общ брой на яйчните маси спрямо общия брой женски индивиди, добавени към клетката за размножение;
- Оплождане — общ брой на оплодените яйчни маси спрямо общия брой женски индивиди, добавени към клетката за размножение;
- оценки на стойностите на крайни точки за токсичността, напр. ЕС_x (и свързаните с тях доверителни интервали), 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.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Глава В.28 от настоящото приложение, Изпитване за токсичност на хирономиди в система вода-седимент с използване на вода с добавка.
- (2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus (Camptochironomus) tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). *Entomologica Scandinavica*, 30: 311–322.
- (3) Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.
- (7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.
- (10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyaella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.
- (11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyaella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 2662-2674.

▼ M6

- (12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, *Ecotoxicology*, 16: 221-230.
- (13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, *Jp. J. Sanit. Zool.*, 48: 345-350.
- (14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), *Jp. J. Sanit. Zool.*, 37: 47-57.
- (15) Глава В.27 от настоящото приложение, Изпитване за токсичност на хирономиди в система вода-седимент с използване на седимент с добавка.
- (16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.
- (17) Weltje, L., Ruffli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, *Integr. Environ. Assess. Management*.
- (18) Environment Canada. (1995), *Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant*, Report EPS 1/RM/30, September 1995.
- (19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. and J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The anti-epileptic drug carbamazepine, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 353-361.
- (20) Suedel, B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1163-1175.
- (21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, *Chemosphere*, 31: 3291-3303.
- (22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50: 1096-1121.
- (23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, 20: 482-491.
- (24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
- (25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531.
- (26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. *J Soils Sediments*, 9: 94-102.
- (27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics*, 48: 577-585.
- (28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, *Water Res.*, 18: 213-221.

▼M6

- (29) Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 1485-1494.
- (30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66: 298-312.
- (31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.
- (32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1165-1176.
- (33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) — baseline experiments for future multi-generation studies, *J. Environ. Sci. Health Part A*, 42: 1-9.
- (34) OECD (2010), *Validation report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

▼ M6*Допълнение 1***Определения**

За целите на настоящия метод за изпитване са използвани следните определения:

Химикал означава вещество или смес.

Формулиран седимент или възстановен, изкуствен или синтетичен седимент, е смес от материали, използвани за симулиране на физичните съставки на естествен седимент.

Вода над седимента е водата, която се намира над седимента в съда за изпитване.

Интерстициална вода, или вода между частиците на седимента е водата, която заема пространството между седимента и частиците на почвата.

Вода с добавка е вода, към която е добавен изпитваният химикал.

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

▼ **M6***Допълнение 2***Препоръки за отглеждане на *Chironomus riparius***

1. Ларвите на *Chironomus* могат да се отглеждат в блюда кристализатори 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. арт. 8117 на Merck) 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 аериране. Съдовете за отглеждане на ларвите следва да се поставят в подходяща клетка, с която да се предотврати напускането на имагиниращите полово зрели индивиди. Клетката следва да бъде с достатъчни размери, за да се даде възможност за оформяне на рой от имагиниращите полово зрели индивиди, защото в противен случай може да не се стигне до копулация (най-малко около 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 на въздуха, 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, дехлорирана 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 се образува хомогенна смес. Така получената смес може да се дава в количество от около 5 ml на съд дневно. (разбърква се преди употреба). По-старите ларви могат да получават повече храна.
5. Храненето се коригира 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 във водата над седимента, 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 имагиниращите възрастни

7. Някои експериментатори изказват идеята, че тампон от памук, напоен с наситен разтвор на захароза, може да се използва за хранене на имагиниращите възрастни.

▼ **M6****Имагиниране**

8. При температура от $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ след приблизително 13—15 дни от съдовете за отглеждане на ларви ще започнат да имагинират полово зрелите индивиди. Мъжките лесно се разпознават по перестите си антени и слабото телосложение.

Яйчни маси

9. Щом в клетката за размножаване се поставят полово зрели индивиди, всички съдове за отглеждане трябва да се проверяват три пъти седмично за полагане на пихтиести яйчни маси. Ако са налице, яйчните маси следва да бъдат внимателно отстранени. Те следва да се преместят в малко блюдо, съдържащо проба от водата за размножаване. Яйчните маси се използват за започване на отглеждане в нов съд за отглеждане (напр. 2—4 яйчни маси/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 отстраняват от изпитването, след като имагинирането на полово зрелите индивиди е завършило. Използването на тази система позволява редовно получаване на полово зрели индивиди с минимална организация.

Приготвяне на разтвори за изпитване „M4“ и „M7“

12. В Elendt (1990) е описана среда „M4“. Среда „M7“ се приготвя като „M4“, освен по отношение на указаните в таблица 1 вещества, при които за „M7“ се използват концентрации, четири пъти по-ниски, отколкото използваните в „M4“. Разтворът за изпитване не трябва да се приготвя според Elendt and Bias (1990), тъй като концентрациите на $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 and K_2HPO_4 , посочени за приготвянето на изходния разтвор, не са подходящи.

Приготвяне на среда „M7“

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 „M7“ петдесет 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 „M7“ малко преди употреба. Изходният разтвор на витамини се съхранява замразен на малки аликвотни части. Средата се аерира и стабилизира.

Таблица 1

Изходни разтвори на микроелементи за среди M4 и M7

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)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_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
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼ **M6**

Изходни разтвори (I)	Количество (mg), разреждано до 1 l с дейонизирана вода	За приготвянето на комбинирания 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)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl ⁽¹⁾	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
SrCl ₂ · 6H ₂ O ⁽¹⁾	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ⁽¹⁾	320	1,0	0,25	0,016	0,004
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O ⁽¹⁾	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
CuCl ₂ · 2H ₂ O ⁽¹⁾	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl ₂ · 6H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O ^{(1) (2)}	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ · 7H ₂ O ^{(1) (2)}	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

⁽¹⁾ Тези вещества се различават в M4 и M7, както е посочено по-горе

⁽²⁾ Тези разтвори се приготвят отделно, изливат се заедно и незабавно се автоклавираат.

Таблица 2

Изходни разтвори на макрохранителни вещества за среди M4 и M7

	Количество, разреждано до 1 l с дейонизирана вода (mg)	Изходни разтвори на макрохранителни вещества, добавяни за приготвяне на среди M4 и M7 (mg/l)	Крайни концентрации в разтвори за изпитване M4 и M7 (mg/l)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

▼ **M6**

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 изходен 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

ПОЗОВАВАНИЯ

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.

Elenkt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, *Protoplasma*, 154: 25-33.

Elenkt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, *Water Research*, 24: 1157-1167.

▼ **M6**

Допълнение 3

Приготвяне на формулиран седимент

СЪСТАВ НА СЕДИМЕНТА

Съставът на формулирания седимент е, както следва:

Съставка	Характеристики	% седимент сухо тегло
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 ≤ 1 mm) и изсушен на въздух	4 — 5
Кварцов пясък	Размер на зърната: > 50 % от частиците следва да бъдат в интервала 50-200 μ m	75 — 76
Каолин	Съдържание на каолинит ≥ 30 %	20
Органичен въглерод	Коригира се чрез добавяне на торф и пясък	2 ($\pm 0,5$)
Калциев карбонат	CaCO ₃ , на прах, химически чист	0,05 — 0,1
Вода	Проводимост ≤ 10 μ S/cm	30 — 50

ПРИГОТВЯНЕ

Торфът се изсушава с въздух и се смля на фин прах. Приготвя се суспензия от изискваното количество торф на прах в дейонизирана вода, като се използва високопроизводително хомогенизиращо устройство. Стойността на рН на тази суспензия се коригира до $5,5 \pm 0,5$ с CaCO₃. Суспензията се аклиматизира най-малко два дни при 20 ± 2 °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 CaCO₃. 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. Формулираният (влажен) седимент не трябва да се съхранява преди употребата му в изпитването. Той следва да се употребява незабавно след 7-дневния период за аклиматизация, с който завършва приготвянето му.

ПОЗОВАВАНИЯ

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. and B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, *Ecotox. Environ. Safety*, 39: 10-20.

▼ **M6***Допълнение 4***Химични характеристики на приемлива вода за разреждане**

СЪСТАВКА	КОНЦЕНТРАЦИИ
Твърди частици	< 20 mg/l
Общ органичен въглерод	< 2 mg/l
Нейонизиран амоняк	< 1 µg/l
Твърдост, изразена като CaCO ₃	< 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

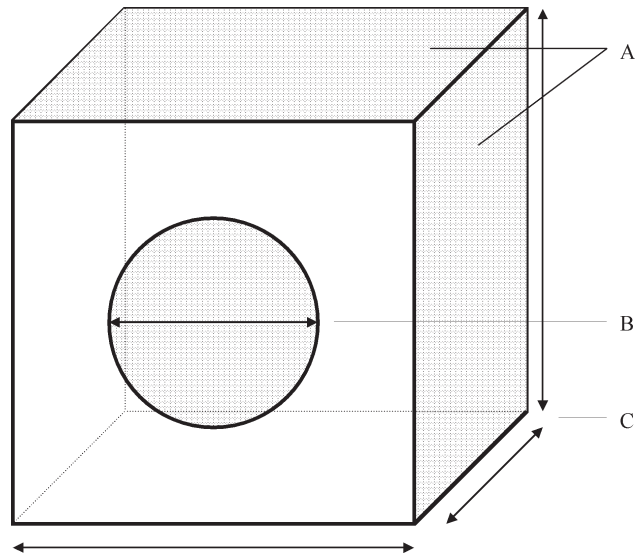
(*) Трябва обаче да се отбележи, че ако се предполага взаимодействие между йоните, от които произтича твърдостта, и изпитвания химикал, следва да се използва вода с по-ниска твърдост (и затова в този случай не трябва да се използва среда „Elendt M4“).

▼ **M6**

Допълнение 5

Насоки за параметрите на изпитването

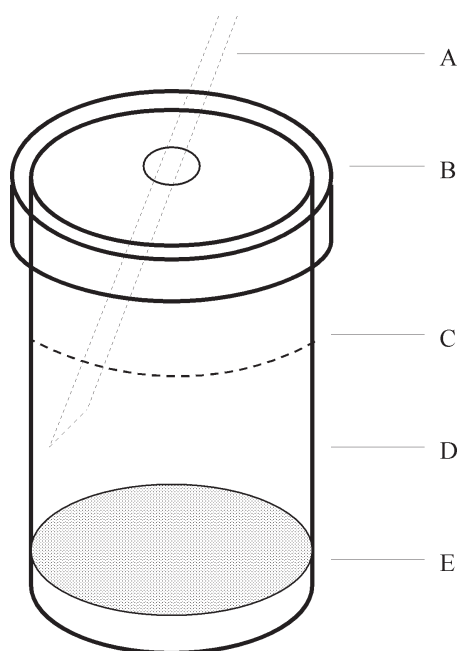
Пример за клетка за размножение:



- A: марля (с размер на отвора приблизително 1 mm) в горната част и една странична част на клетката като минимум
- B: отвор за поставяне на имагиниралите възрастни в клетката за размножение, както и за отстраняване на положените яйчни маси от блюдата кристализатори (не е показан на тази графика)
- C: клетка за размножаване с минимални размери 30 cm дължина, 30 cm ширина и 30 cm височина

▼ M6

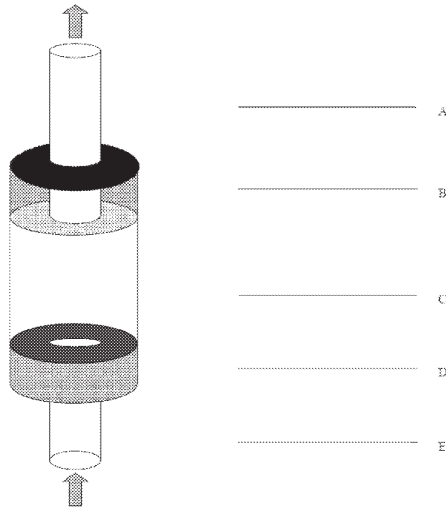
Пример за съд за изпитване:



- A: пипета „Пастьор“ за подаване на въздух във водата над седимента
- B: стъклен капак за предотвратяване на напускането на имажиниралите индивиди
- C: воден слой
- D: съд за изпитване (стъклена бехерова чаша с минимална вместимост 600 ml)
- E: слой на седимента

▼ **M6**

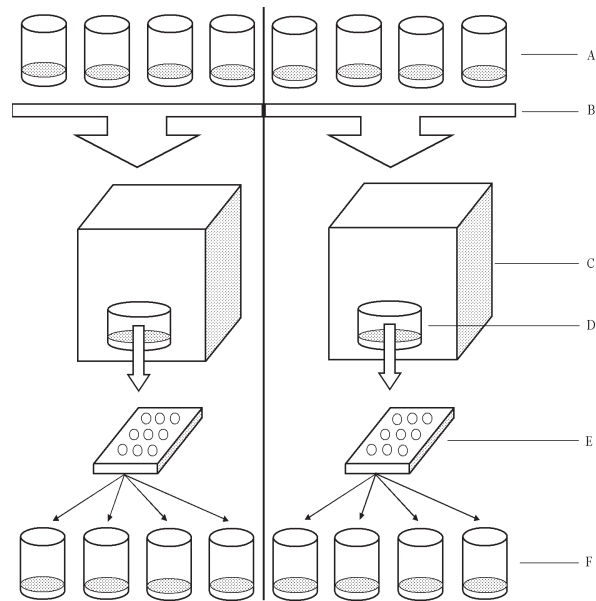
Пример за всмукателен вентилатор за улавяне на полово зрелите индивиди (стрелките указват посоката на въздушния поток):



- A: стъклена тръба (вътрешен диаметър приблизително 5 mm), свързана със самозасмукваща помпа
- B: запушалка от вулканизиран каучук, перфорирана със стъклена тръба (A). от вътрешната страна отворът на стъклената тръба (A) е покрит с малко памук и марля (размер на отворите около 1 mm), за да се избегне увреждане на индивидите при засмукването им във всмукателния вентилатор
- C: прозрачен контейнер (пластмасов или стъклен, дължина около 15 cm) за уловените индивиди
- D: корк от вулканизиран каучук, перфориран с тръба (D). За освобождаване на индивидите в клетката за размножаване, коркът Г се освобождава от контейнера В
- E: тръба (пластмаса или стъкло, вътрешен диаметър приблизително 8 mm) за събиране на полово зрелите индивиди от съда

▼ **M6**

Схематично представяне на изпитване за целия жизнен цикъл:



- A: 1-во поколение — съдове за изпитване, съдържащи система седимент-вода, осем повторения, 20 ларви в първи ларвен стадий на съд
- B: четири съда за изпитване за всяка клетка за размножаване, A и B
- C: клетки за размножаване (A и B) за роене, чифтосване и яйцепологане
- D: блюда кристализатори за полагане на яйчни маси
- E: микроплаки, по едно гнездо за всяка яйчна маса
- F: 2-ро поколение — съдове за изпитване, съдържащи система седимент-вода, осем повторения, 20 ларви в първи ларвен стадий на съд.

▼ M6

B.41. ИЗПИТВАНЕ ЗА РАЗВИТИЕ НА ПОЛА ПРИ РИБИТЕ

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСР (TG) 234 (2011). Той се основава на решение от 1998 г. за разработване на нови или актуализиране на съществуващи методи за изпитване за скрининг и изпитвания за потенциални нарушители на функциите на ендокринната система. Изпитването за развитие на пола при рибите (ИРПР) бе идентифицирано като многообещаващ метод за изпитване, обхващащ чувствителен стадий от жизнения цикъл на рибите, с отклик на химикали, подобни както на естроген, така и на андроген. Методът за изпитване е преминал през междулабораторно валидиране, извършено от 2006 до 2010 г., при което японската оризия (*Oryzias latipes*), зебровото данио (*Danio rerio*) и трииглата бодливка (*Gasterosteus aculeatus*) са били валидирани, а *Pimephales promelas* е била частично валидирана (41) (42) (43). Настоящият протокол включва японската оризия, трииглата бодливка и зебровото данио. Протоколът по принцип е усъвършенствен вариант на Насоки на ОИСР 210 „Риби, изследване на токсичността в ранния жизнен стадий“ (1), при който експозицията продължава докато полът на рибите се диференцира, т.е. около 60 дни след излюпването (dph) за японската оризия, трииглата бодливка и зебровото данио (периодът на експозиция може да е по-кратък или по-дълъг за други видове, валидирани в бъдеще), и се добавят чувствителни за функциите на ендокринната система крайни точки. Чрез ИРПР се оценява въздействието в ранните етапи от жизнения цикъл, както и потенциалните неблагоприятни последици за развитието на пола от химикали, за които се предполага, че нарушават функциите на ендокринната система (напр. естрогени, андрогени и инхибитори на стероидогенезата). Комбинацията от двете основни крайни точки за ендокринната система — концентрацията на вителогенин (VTG) и фенотипното съотношение между половете позволява на изпитването да посочи начина на действие на изпитвания химикал. Поради значими за популацията изменения на фенотипното съотношение между половете, ИРПР може да се използва за оценка на опасността и риска. Независимо от това, ако изпитването се използва за оценка на опасността или риска, не следва да се използва бодливката, тъй като наличните до момента данни от валидирането са показали, че при този вид не са обичайни предизвиканите от изпитвания химикал изменения на съотношението между фенотипните полове.
2. Протоколът се основава на риби, експонирани на въздействието на химикали чрез водата по време на периода между диференцирането на гонадите и образуването на първите гамети, през който рибите се очаква да бъдат по-чувствителни към въздействията от химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система, които пречат на развитието на пола. Две основни крайни точки се измерват като показатели за свързани с ендокринната система отклонения в развитието — концентрациите на VTG и съотношенията между половете (дялове на съответните полове), определяни чрез хистология на гонадите. Хистопатологията на гонадите (оценка и определяне на етапите при овоцитите и сперматогенните клетки) е по избор. Освен това, когато е възможно, се определя генетичният пол (напр. при японската оризия и трииглата бодливка). Присъствието на маркер за генетичния пол е значително предимство, защото увеличава мощността на статистиките за съотношението между половете и дава възможност за откриване на индивидуална инверсия на фенотипния пол. Други апикални крайни точки, които трябва да бъдат измерени, включват процент на излюпване, преживяване, дължина и телесно тегло. Този метод за изпитване може да се приспособява към видове, различни от посочените по-горе, при условие че другите видове бъдат подложени на валидиране, еквивалентно на извършеното за японската оризия, трииглата бодливка и зебровото данио, че рибите в контролите са полово диференцирани в края на изпитването, че нивата на VTG са достатъчно високи за откриване на значимо вариране, свързано с химикалите, и че чувствителността на системата за изпитване се определя с използване на ендокринно активни референтни химикали ((анти)-естрогени, (анти)-андрогени, инхибитори на ароматазата и др.). В допълнение, всеки протокол (или протоколи) за валидиране, позоваващ се на данни от ИРПР с използване на други видове, следва да бъде проверен от ОИСР и резултатът от валидирането следва да се смята за задоволителен.

▼ **M6****Първоначални съображения и ограничения**

3. VTG обикновено се произвежда от черния дроб на женски яйценосни гръбначни животни в отговор на циркулиращия ендogenous естроген (2). Той е прекурсор на белтъците в яйчния жълтък и след образуването си в черния дроб преминава в кръвообращението, откъдето стига до яйчника и там се модифицира в образуващия се хайвер. Синтезът на VTG е много ограничен, макар и забележим, в недостигнали полова зрялост риби и в полово зрели мъжки риби, поради липса у тях на достатъчно количество циркулиращ естроген. Черният дроб обаче може да синтезира и секретира VTG в отговор на външно естрогенно стимулиране (3) (4) (5).
4. Измерването на VTG служи за откриване на химикали с естрогенен, анти-естрогенен и андрогенен начин на действие, и на химикали, които пречат на стероидогенезата, например като инхибитори на ароматазата. Откриването на химикали с естрогенно действие е възможно чрез измерване на индуцирането на VTG в мъжки риби, и е много добре документирано в научната литература, преминала през партньорска проверка. Индуциране на VTG е доказано и след експозиция на андрогени, които могат да се ароматизират (6) (7). Намалването на равнището на циркулиращ естроген в женските животни, например посредством инхибиране на ароматазата, превръщаща ендogenous андроген в природния естроген 17 β -естрадиол, води до намаляване на концентрацията на VTG, което се използва за откриване на химикали, притежаващи свойства на инхибитори по отношение на ароматазата или, по-общо, на инхибитори на стероидогенезата (33). Биологичната значимост на отговора с VTG след естрогенно/ароматазно инхибиране е установена и е широко документирана (8) (9). Възможно е обаче образуването на VTG в женски животни да е също така повлияно от обща токсичност и начини на токсично действие, различни от ендокринните.
5. Няколко методи за измерване са успешно разработени и стандартизирани за рутинна употреба, за количествено определяне на VTG във взети от отделни риби проби в кръвта, в черния дроб, в цялото тяло или в хомогенат глава/опашка. Такъв е случаят със зебровото данио, триглата бодливка и японската оризия, както и с частично валидирания вид *Pimephales promelas*; На разположение са специфични за отделните видове ензимно-свързани имуносорбентни анализи (ELISA), използващи имунохимия за количествено определяне на VTG (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). При японската оризия и зебровото данио съществува добра корелация между VTG, измерен в проби от кръвна плазма, черен дроб и хомогенат, въпреки че при хомогенати като цяло се получават малко по-ниски стойности, отколкото от плазма (17) (18) (19). В допълнение 5 са дадени препоръчителните процедури за събирането на проби за анализ на VTG.
6. Промяна в съотношението между фенотипните полове на (дялове на съответните полове) е крайна точка, отразяваща инверсията на пола. По принцип естрогените, анти-естрогените, андрогените, анти-андрогените и химикалите, потискащи стероидогенезата, могат да повлияят на съотношението между половете при развиващи се риби (20). Доказано е, че тази инверсия на пола е отчасти обратима при зебровото данио (21) след експозиция на химикал, сходен с естроген, докато инверсията на пола след експозиция на химикал, сходен с андроген, е окончателна (30). Полът се дефинира като женски, мъжки, междинен (в една гонада има както овоцити, така и сперматогенни клетки) или недиференциран, и се определя в отделните риби чрез хистологично изследване на гонадите. Указания са дадени в допълнение 7 и в Ръководството на ОИСР за диагностициране на свързана с ендокринната система хистопатология на гонадите при риби (22).
7. Генетичният пол се проверява чрез генетични маркери, когато има такива в даден вид риби. При японската оризия женските XX или мъжките XY гени могат да бъдат открити чрез полимеразна верижна

▼ **M6**

реакция (PCR), или свързаният с Y ген от домен DM (DMY) може да бъде анализиран (DMY-отрицателен или положителен), както е описано в (23) (24). При триглата бодливка има еквивалентен PCR метод за определяне на генетичния пол, описан в допълнение 10. Когато генетичният пол може да бъде индивидуално свързан с фенотипния пол, мощта на теста се подобрява и следователно генетичният пол следва да бъде определян във видовете с документираните маркери за генетичния пол.

8. Двете основни ендокринни крайни точки, VTG и съотношението между половете, могат в съчетание да докажат ендокринния начин на действие (НД) на химикала (таблица 1). Съотношението между половете е значим за популацията биомаркер (25) (26) и за някои ясно определени начини на действие резултатите от ИРПР могат да бъдат използвани за целите на оценката на опасността и риска, когато това се счита за целесъобразно от регулаторния орган. Тези начини на действие са настоящем естрогените, андрогените и инхибиторите на стероидогенезата.

Таблица 1

Реакция на ендокринните крайни точки за различни начини на действие на химикали:

↑ = нараства, ↓ = намалява, — = не е изследвано

НД	VTG ♂	VTG ♀	Съотношение между половете;	Позовавания
Слаб естрогенен агонист	↑	↑	↑ ♀ или ↑Недифер	(27) (40)
Силен естрогенен агонист	↑	↑	↑ ♀ или ↑Недифер, няма ♂	(28) (40)
Естрогенен антагонист	—	—	↓♀, ↑Недифер.	(29)
Андрогенен агонист	↓ или —	↓ или —	↑ ♂, няма ♀	(28) (30)
Андрогенен антагонист	—	—	↑♀ ↑Междижен пол	(31)
Инхибитор на ароматазата	↓	↓	↓♀	(33)

9. ИРПР не обхваща стадия на размножаване на рибите и следователно химикалите, за които се предполага, че влияят върху размножаването при концентрации, по-ниски тези за развитието на пола, следва да бъдат проучени в изпитване, обхващащо размножаването.
10. Определенията, използвани за целите на настоящия метод за изпитване, са дадени в допълнение 1.
11. ИРПР *in vivo* е предназначен за откриване на химикали с андрогенни и естрогенни свойства, както и анти-андрогенни, анти-естрогенни и потискащи стероидогенезата свойства. Фазите на валидирането на ИРПР (1 и 2) не обхващат естрогенни, андрогенни и потискащи стероидогенезата химикали. Въздействията в ИРПР на естрогенни и андрогенни антагонисти може да се види в таблица 1, но тези ЕНД са по-слабо документираны към момента.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

12. При изпитването рибите се експонират от новооплодения хайвер до завършването на половата диференциация, най-малко на три концентрации на изпитвания химикал, разтворен във вода. Изпитването трябва да е при проточни условия, освен ако това не е възможно поради наличието или природата (напр. ограничена разтворимост) на изпитвания химикал. Изпитването започва с поставянето на новооплодени хайверни зърна (преди дробенето на бластодиска) в камерите за изпитване. Зареждането на камерите е описано за всеки вид в точка

▼ **M6**

27. За валидираните рибни видове (японската оризия, трииглата бодливка и зебровото данио) изпитването приключва на 60 dph. При приключването на изпитването всички риби се умъртвяват по хуманен начин. От всяка риба се взема биологична проба (кръвна плазма, черен дроб или хомогенат глава/опашка) за анализ на VTG, а останалата част се фиксира за хистологична оценка на гонадите с цел определяне на фенотипния пол; по избор може да бъде извършвана хистопатология (например определяне на етапите при гонадите, степен на проява на междинния пол). Биологична проба (аналната или гръбната перка) за определяне на генетичния пол се взема от видовете, притежава подходящите маркери (допълнения 9 и 10).

13. Преглед на съответните условия на изпитване, специфични за валидираните видове: японската оризия, трииглата бодливка и зебровото данио) е даден в допълнение 2.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНИЯ ХИМИКАЛ

14. На разположение следва да са резултати от изпитване за остра токсичност или друго краткосрочно изследване за токсичност [напр. метод за изпитване В.14 (34), и насоки на ОИСП 210 (1)], за предпочитане извършено с видовете, избрани за настоящото изпитване. Това предполага, че разтворимостта във вода и парното налягане на изпитвания химикал са известни и е налице надежден аналитичен метод за количествено определяне на химикала в камерите за изпитване с позната и протоколирана точност и граница на откриване.
15. Друга полезна информация включва структурната формула, чистотата на химикала, стабилността му във вода или на светлина, рКа, P_{ow} и резултатите от изпитване за пълна биоразградимост (вж. метод В.4) (35).

Критерии за приемане на изпитването

16. За да са приемливи резултатите от изпитването, се прилагат следните условия:
- концентрацията на разтворен кислород трябва да бъде най-малко 60 от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух (ASV) по време на извършването на изпитването;
 - температурата на водата трябва да се различава с не повече от $\pm 1,5$ °C между камерите за изпитване по всяко време на провеждането на изпитването, и се поддържа в рамките на температурните диапазони, посочени за изпитваните видове (допълнение 2).
 - Следва да е на разположение валидиран метод за анализ на химикала за експозицията, като границата на откриване на този метод следва да е доста под най-ниската номинална концентрация, и следва да се съберат доказателства, доказващи, че концентрацията на изпитвания химикал в разтвор е била задоволително поддържана в рамките на ± 20 % от средните измерени стойности;
 - цялостното преживяване на оплодените хайверни зърна в контролите и, където е относимо, в контролите на разтворител, трябва да бъде по-голямо или равно на границите, определени в допълнение 2;
 - Критерии за приемане, свързани с растежа и дяловете на половете при приключването на изпитването се основават на данни от контролните групи (обединени контроли на разтворител и на вода, освен ако те се различават значимо, като в последния случай само на разтворител):

▼ M6

		японска оризия	зеброво данно	триигла бодливка
Растеж	Риба, мокро тегло, след попиване	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Дължина (стандартна дължина)	> 20mm	> 14 mm	> 20 mm
Съотношение между половете (% мъжки или женски)		30-70 %	30-70 %	30-70 %

- Когато се използва разтворител, той следва да няма статистически значимо въздействие върху преживяването и трябва да не предизвиква никакво нарушаване на функциите на ендокринната система или други вредни въздействия на ранните стадии от жизнения цикъл, което се вижда при контрола на разтворител.

Ако се наблюдава отклонение от критериите за приемане на изпитването, последиците следва да се съобразят с надеждността на данните от изпитването и тези съображения следва да бъдат включени в протоколирането.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

Камери за изпитване

17. Могат да се използват всякакви камери от стъкло, неръждаема стомана или други химически неутрални материали. Камерите следва да са достатъчно широки, за да съответстват на критериите за степен на зареждане, посочени по-долу. Препоръчва се камерите за изпитване да са разположени на случаен принцип в зоната на извършване на изпитването. Рандомизираният блоков план, при който всяка концентрация е налична във всеки блок, се предпочита пред напълно рандомизирания. Камерите за изпитване следва да са защитени от нежелани смущения.

Избор на видове

18. Препоръчаните видове риби са дадени в допълнение 2. Процедурите за включване на нови видове са дадени в точка 2.

Отглеждане на родителски индивиди

19. Подробности относно съхраняването на родителските риби при задоволителни условия могат да се намерят в насоки на ОИСП 210 (1). Родителските риби следва да бъдат хранени веднъж или два пъти дневно с подходяща храна.

Третиране на ембрионите и ларвите

20. Първоначално ембрионите и ларвите могат да се експонират, в рамките на основната камера, в по-малки камери от стъкло или неръждаема стомана, снабдени със страни или краища с отвори, за да се позволи потокът на изпитвания химикал през камерата. Може да се предизвика слаб поток през тези малки камери чрез поставянето им на ръчка, монтирана да премества съда нагоре и надолу, но като запазва винаги организмите във водата.
21. Когато за задържане на хайвера в основната камера за изпитване са били използвани контейнери с хайвер, решетки и сита, тези ограничители се отстраняват след излюпването на ларвите, с изключение на ситата, които следва да се задържат, за да се предотврати изпускането на рибите. Ако има нужда от прехвърляне на ларвите, те следва да не се излагат на въздух и не следва да се използват мрежи, да за се освободи рибата от контейнерите с хайвера. Графикът за това прехвърляне е различен за различните видове, и прехвърлянето не винаги е необходимо.

▼ **M6****Вода**

22. Всяка вода, в която изпитваният вид показва преживяване в контролата най-малко толкова, каквото и във водата, описана в допълнение 3, е подходяща да се използва като вода за изпитването. Необходимо е постоянно качество на водата по време на изпитването. За да се гарантира, че водата за разреждане няма да повлияе неправилно върху резултата от изпитването (например чрез реагиране с изпитвания химикал) или да навреди на родителите, пробите за анализ следва да се вземат на интервали. Общият органичен въглерод, проводимостта, рН и суспендираните твърди вещества следва да се измерват, например на всеки три месеца, когато се знае, че водата за разреждане има относително постоянно качество. Ако качеството на водата не е сигурно, следва да се правят измервания за тежки метали (например Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), основни аниони и катиони (например Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}) и пестициди. Подробности относно химичния анализ и събирането на водата могат да бъдат намерени в точка 34.

Разтвори за изпитване

23. Следва да се използва проточна система, ако е практически възможно. За изпитванията с проточна система се изисква система, която постоянно подава и разрежда изходен разтвор на изпитвания химикал (например система с измерваща помпа, пропорционално разреждащо устройство и сатуратор), за да се подават серии от концентрации към камерите за изпитване. Дебитът на изходните разтвори и този на водата за разреждане следва да се проверяват на интервали по време на изпитването и през това време не следва да се променят с повече от 10 %. За подходящ се счита дебит, равен на поне пет обема на камера за изпитване за 24 часа (1). Трябва внимателно да се избягва използването на пластмасови тръби или други материали, някои от които могат да съдържат биологично активни химикали или могат да адсорбират изпитвания химикал.
24. Изходният разтвор се приготвя за предпочитане без използване на разтворители, чрез просто смесване и разбъркване на изпитвания химикал във водата за разреждане, като се използват механични средства (например разклащане или ултрасонификация). Ако разтварянето на изпитвания химикал във вода е трудно, трябва да бъдат следвани процедурите, описани в ръководството на ОИСР с насоки за изпитване за токсичност във водна среда на трудни вещества и смеси (36). Използването на разтворители следва да се избягва, но в някои случаи може да се наложи, с цел да се получи изходен разтвор с подходяща концентрация. Примери за подходящи разтворители са дадени в (36).
25. Условиата на полустатично изпитване следва да се избягват, освен в случаите, когато е представена обосновка за наложителни причини, свързани с изпитвания химикал (например стабилност, ограничена наличност, високи разходи или опасност). При полустатичните техники могат да се следват две различни процедури за обновяване — или се приготвят нови разтвори за изпитване в чисти камери и преживелите хайверни зърна и ларви внимателно се пренасят в новите камери, или изпитваните организми се запазват в камерите за изпитване, като известен дял (поне две трети) от водата за изпитване се сменя ежедневно.

ПРОЦЕДУРА**Условия на експозиция***Събиране на хайвер и продължителност*

26. За да се избегне отклонение в генетично отношение, хайверът се събира от минимум три на брой двойки за размножаване или групи, смесени и избрани на случаен принцип за започване на изпитването. За трииглата бодливка, вж. описанието за изкуствено оплождане в допълнение 11. Изпитването трябва да започне възможно най-бързо

▼ M6

след оплождането на хайвера, като е за предпочитане ембрионите да са потопени в разтворите за изпитване преди започването на дробенето на бластодиска или колкото е възможно по-скоро след този етап, и не по-късно от 12 часа след оплождането. Изпитването трябва да продължи до приключването на половата диференциация в контролната група (60 dph за японската оризия, трииглата бодливка и зебровото данио).

Зареждане

27. Броят на оплодените хайверни зърна в началото на изпитването следва да е поне 120 на концентрация, разделени между минимум 4 повторения (допустимо е разпределяне към контролата с използване на корен квадратен). Хайверните зърна следва да са разпределени на случаен принцип (с помощта на статистически таблици за рандомизация) сред третираната група. Скоростта на зареждане (за определение вж. допълнение 1) следва да е достатъчно ниска с цел да се поддържа концентрация на разтворения кислород от поне 60 % от ASV без директно аериране на камерите. За изпитванията с проточна система се препоръчва скорост на зареждане не по-голяма от 0,5 g/l за 24 часа и не повече от 5 g/l от развора по всяко време. Не по-късно от 28 дни след оплождането броят на рибите на повторение следва да бъде преразпределен така, че броят на рибите във всяко повторение да бъде колкото е възможно по-близък до равния. Ако се появи смъртност, свързана с експозицията, броят на отделните повторения следва да бъде намален до подходящ размер, така че гъстотата на рибите между нивата на третиране да се поддържа със стойности колкото е възможно по-близо до равните.

Светлина и температура

28. Периодът на осветеност и температурата на водата следва да са подходящи за изпитваните видове (вж. допълнение 1 за опитните условия за ИРПР).

Хранене

29. Храната и храненето са изключително важни и е от съществено значение да се предоставя подходящата храна за всеки етап, на подходящи времеви интервали и в количества, които са достатъчни за поддържане на нормален растеж. Храненето следва да бъде *ad libitum* при същевременно свеждане до минимум на излишъка. За осигуряване на достатъчна скорост на растеж рибите следва да бъдат хранени поне два пъти на ден (допустимо е веднъж на ден в събота и неделя), на интервал от поне три часа между всяко хранене. Излишната храна и изпражненията трябва да бъдат отстранявани, когато е необходимо, за да се избегне натрупване на отпадъци. С натрупването на опит храната и хранителните режими непрекъснато се усъвършенстват с оглед подобряване на преживяемостта и оптимизиране на растежа. Следователно трябва да се положат усилия да се потвърди предлаганият режим с признати експерти. Храна не следва да се предоставя 24 часа преди приключването на изпитването. Примери за подходящи хранителни продукти са изброени в допълнение 2 (Вж. също рамката на ОИСП за изпитвания върху риб (39)).

Концентрации на изпитване

30. Концентрациите на изпитваните химикали следва да бъдат разположени както е описано в допълнение 4. Следва да бъдат използвани минимум три концентрации за изпитването, с най-малко по четири повторения. Когато се избира диапазонът на концентрациите на изпитване следва да се има предвид кривата, свързваща LC₅₀ и периода на експозиция при наличните проучвания за остра токсичност. Ако данните ще бъдат използвани за оценка на риска, препоръчителни са пет концентрации на изпитване.
31. Не е нужно да се изпитват концентрации на химикала, по-високи от 10 % от LC₅₀ за остра токсичност при половозрели индивиди, или 10 mg/l, според това коя от двете е по-ниска. Максималната концентрация на изпитване следва да е 10 % от стойността на LC₅₀ за стадий ларви/ювенилни екземпляри.

▼ **M6****Контроли**

32. Една контрола на вода за разреждане (≥ 4 повторения) и, ако е относимо, контрола на разтворител (≥ 4 повторения), следва да бъдат включени допълнително към концентрациите на изпитване. По време на изпитването следва да се използват само разтворители, за които е проучено, че нямат статистически значимо влияние върху крайните точки от изпитването.
33. Когато се използва разтворител, неговата крайна концентрация не следва да е по-висока от 0,1 ml/l (36) и концентрацията следва да бъде една и съща във всички камери за изпитване, с изключение на контролата на вода за разреждане. Въпреки това, следва да се положат всички усилия, за да се избегне употребата на такъв разтворител, или неговите концентрации следва да бъдат поддържани на минимално равнище.

Честота на аналитичните определяния и измервания

34. Преди започване на изпитването следва да бъде извършен химичен анализ на концентрацията на изпитвания химикал, за да се провери съответствието с критериите за приемане. Всички повторения трябва да бъдат анализирани поотделно в началото и в края на изпитването. Едно повторение за всяка концентрация на изпитване трябва да се анализира поне веднъж на седмица по време на изпитването, като повторенията се сменят системно (1,2,3,4,1,2...). Ако се съхраняват проби, за да бъдат анализирани по-късно, методът за съхранение на пробите следва да бъде предварително валидиран. Пробите следва да бъдат филтрувани (например с използване на размер на порите 0,45 μm) или центрофугирани, за да се гарантира, че определянията на химикала се правят в истински разтвор.
35. По време на теста следва да бъдат измервани разтвореният кислород, рН, общата твърдост, проводимостта, солеността (ако е относима) и температурата във всяка камера за изпитване. Като минимум разтвореният кислород, солеността (ако е относима) и температурата трябва да се измерват всяка седмица, а рН, проводимостта и твърдостта — в началото и в края на изпитването. За предпочитане е температурата да се наблюдава непрекъснато най-малко в една камера за изпитване.
36. Резултатите следва да се основават върху измерените концентрации. Обаче ако концентрацията на изпитвания химикал в разтвора е поддържана на задоволително ниво в рамките на $\pm 20\%$ от номиналната концентрация по време на изпитването, тогава резултатите могат да се основават или на номиналната, или на измерената стойност.

Наблюдения и измервания*Стадий на ембрионално развитие*

37. Експозицията следва да започне колкото е възможно по-скоро след оплождането и преди започването на дробенето на бластодиска, и не по-късно от 12 часа след оплождането, за да се гарантира експозиция по време на ранното ембрионално развитие.

Излюпване и преживяване

38. Наблюденията върху излюпването и преживяването се правят поне веднъж на ден и се записва броят. Мъртвите ембриони, ларви и ювенилни екземпляри следва да се отстраняват веднага след като са забелязани, тъй като могат да се разложат бързо и да бъдат разкъсани от действията на другите риби. При отстраняването на мъртвите индивиди се полага изключителна грижа да не се ударят и да не се наранят физически близкостоящите хайверни зърна/ларви, които са изключително деликатни и чувствителни. Критериите за смърт варират в зависимост от етапа от жизнения цикъл:

— за хайверни зърна: по специално в ранните етапи това са: явна загуба на прозрачност и изменение в оцветяването, причинени от коагулация и/или утаяване на белтъци, водещи до бял непрозрачен вид,

▼ **M6**

- за ларвите и ювенилните екземпляри: неподвижност и/или липса на дишателни движения и/или липса на сърдечен ритъм и/или бяло непрозрачно оцветяване на централната нервна система и/или липса на реакция при механично стимулиране.

Необичаен външен вид

39. Броя на ларвите, които показват необичайна форма на тялото, следва да се запише, а външният вид и природата на необичайността във външния вид следва да се опише. Следва да се отбележи, че ембрионите и ларвите с необичаен външен вид се появяват по нормален начин и могат да бъдат от порядъка на няколко процента от контролата(ите) при някои видове. Индивидите с необичаен външен вид следва да се отстраняват от камерите за изпитване само при смърт. 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 обаче, ако аномалии водят до болка, страдание и дистрес или трайно увреждане, и леталният изход може да бъде предвиден по надежден начин, животните следва да бъдат подложени на анестезия и евтаназия съгласно описанието в точка 44, и да се третира като смъртност при анализа на данните.

Необичайно поведение

40. Аномалните състояния, като хипервентилация, некоординирано плуване, нетипично състояние на покой и нетипично поведение при хранене, следва да се записват при появяването им.

Тегло

41. В края на изпитването всички преживели риби следва да бъдат подложени на евтаназия (на анестезия, ако следва да се вземат кръвни проби) и следва да бъде измерено индивидуалното им мокро тегло (след попиване на водата).

Дължина

42. В края на изпитването следва да се измери индивидуалната дължина (стандартната дължина).
43. В резултат от тези наблюдения, за протоколирането ще бъдат налични някои или всички от следните данни:

- кумулативна смъртност;
- брой на здравите риби в края на изпитването;
- време за започване на излюпването и приключване на излюпването;
- дължина и тегло на преживелите индивиди;
- брой на деформирани ларви;
- брой на рибите, проявили необичайно поведение.

Вземане на проби от риби

44. Пробовземането от рибите се извършва при приключване на изпитването. Рибите, от които се вземат проби, следва да бъдат подложени на евтаназия, напр. с MS-222 (100-500 mg на l, буфериран с 200 mg NaHCO₃ на l) или FA-100 (4-алил-2-метоксифенол: евгенол) и да бъдат индивидуално измерени и претеглени като мокро тегло (след попиване на водата) или да бъдат подложени на анестезия, ако следва да се взема кръвна проба (вж. точка 49).

Вземане на проби за анализ на VTG и определяне на пола чрез хистологична оценка

45. Трябва да се извърши пробовземане на всички риби и същите да се подготвят за анализ на пола и на VTG. Всички риби трябва да се анализират хистологично за определяне на пола. За измерванията на

▼ **M6**

VTG се допуска вземане на подпроба от най-малко 16 риби от всяко повторение. Ако резултатите от подпробата се окажат неясни, следва повече риби да бъдат анализирани за VTG.

46. Процедурата за вземане на проби за определяне на пола и VTG зависи от метода за анализ на VTG:

Метод за анализ на VTG с хомогенат глава/опашка

47. Рибата се подлага на евтаназия. Главата и опашката на всяка риба се отделят от тялото на рибата чрез направени със скалпел разрези точно зад коремните перки и точно зад гръбната перка (вж. фигура 1). Частите от всяка риба, представляващи главата и опашката, се обединяват, претеглят се и индивидуално се номерират, замразяват се в течен азот и се съхраняват при температура – 70 °C или по-ниска, за анализ на VTG. Частта от рибата, представляваща тялото, се номерира и фиксира в подходящ фиксатор, за хистологична оценка (22). С използването на този метод VTG и хистопатологията се оценяват за всеки индивид и по този начин евентуална промяна в нивото на VTG може да бъде свързана с фенотипния пол на рибата, или с генетичния пол (японската оризия и трииглата бодливка) на рибата. За повече информация вж. насоки за хомогенизиране (допълнение 5) и насоки за количествено определяне на VTG (допълнение 6).

Метод за анализ на VTG с хомогенат черен дроб

48. Рибата се подлага на евтаназия. Извършва се дисекция на черния дроб и същият се съхранява при температура – 70 °C или по-ниска. Препоръчителни процедури за отрязването и предварителното обработване на черния дроб са дадени в насоки на ОИСП 229 (37) или в глава В.37 от настоящото приложение (38). Черният дроб се хомогенизира индивидуално, както е описано в насоки на ОИСП 229 или глава В.37 от настоящото приложение. Супернатантатът се събира и се използва за измерване с VTG хомоложна ELISA техника (вж. допълнение 6 за пример за количествено определяне при зебровото данио, или насоки на ОИСП 229 (37) за японската оризия). При следване на този подход също така е възможно получаването на индивидуални данни за рибите както по отношение на VTG, така и на хистологията на гонадите.

Метод за анализ на VTG с кръвна плазма

49. Кръв се взема от подложена на анестезия риба чрез сърдечна пункция, от опашната вена или чрез разрез на опашката, и се центрофугира при 4 °C за събиране на плазма. Плазмата се съхранява при – 70 °C или още по-ниска температура, докато не бъде използвана. Цялата риба се подлага на евтаназия и се фиксира за хистологията. Пробата от плазма, както и рибата, се номерират индивидуално, за да се свържат нивата на VTG с пола на рибата.

Фигура 1:

Как да се направи разрез на риба за измерване на VTG в хомогенат глава/опашка и за хистологична оценка на средната част



▼ **M6***Определяне на генетичния пол*

50. Биологична проба за определяне на генетичния пол се взема от всяка риба, която е от биологичен вид, притежаващ подходящите маркери. За японската оризия се взема ананалната перка или гръбната перка. Подробно описание е дадено в допълнение 9, включително вземане на тъканни проби и определяне на пола чрез метод с PCR. Аналогично, в допълнение 10 е дадено описание на вземане на тъканни проби и определяне на пола чрез метод с PCR за трииглата бодливка.

Измерване на VTG

51. Измерването на VTG следва да се основава на валидиран за анализ количествен метод. Следва да бъде на разположение информация за варирането на метода, използван от дадена лаборатория — в рамките на дадено изследване, както и между изследванията. Източникът на между- и вътрешнолабораторното вариране (най-вероятно) се основава на различните стадии от развитието на рибната популация. Като се има предвид варирането на измерването на VTG, стойностите на NOEC въз основа единствено на тази крайна точка следва да бъдат третираны много внимателно. За рибните видове, разглеждани в настоящото изследване, съществуват различни методи за оценка на образуването на VTG. Техника за измерване, която е едновременно относително чувствителна и специфична, е определянето на концентрациите на белтъци чрез ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA). Следва да се използват хомоложни антители (срещу VTG от същия биологичен вид) и най-важните хомоложни стандарти.

Определяне на пола

52. В зависимост от процедурата за вземане на проби за VTG, цяла риба или оставащата средна част от всяка риба се поставя в предварително етикетирани касета за обработка и се фиксира с подходящ фиксатор за хистологично определяне на пола (по избор и за оценка на етапите при гонадите). Насоки за фиксирането и включването са дадени в допълнение 7 и в Ръководството на ОИСР за диагностициране на свързана с ендокринната система хистопатология на гонадите при риби (22). След обработката рибите се включват в парафинови блокчета. Индивидите следва да бъдат поставени надлъжно в парафиновите блокчета. От всеки индивид се вземат най-малко шест надлъжни среза (с дебелина 3-5 μm) във фронтална равнина, включително гонадна тъкан от двете гонади. Разстоянието между тези срезове следва да бъде приблизително 50 μm за мъжките и 250 μm за женските индивиди. Независимо от това, тъй като всяко блокче често съдържа и мъжки, и женски (ако във всяко блокче е включен повече от един индивид), разстоянието между срезовете от тези блокчета трябва да е около 50 μm , докато бъдат получени поне шест среза от гонадите от всеки мъжки индивид. След това разстоянието между срезовете може да бъде увеличено до 250 μm за женските. Срезове се оцветяват с хематоксилин и еозин и се изследват с оптична микроскопия с фокусиране върху пола (мъжки, женски, междинен или недиференциран). Междинният пол се определя като наличие на повече от един овоцит в тестисите за шест анализирани среза, или сперматогенни клетки (да/не) в яйчниците. Хистопатологията и определянето на етапите на яйчниците и тестисите са по избор, но ако се изследват, трябва да се извърши статистически анализ на резултатите и те следва да се протоколират. Следва да се отбележи, че някои видове риби не разполагат по естествен път с напълно развит чифт гонади и може да е налице само една гонада (напр. японската оризия и, понякога, зебровото данио). Всички подобни наблюдения трябва да бъдат записани.
53. Определянето на генетичния пол в отделния индивид японска оризия се основава на наличието или отсъствието на определящия мъжкия пол на оризията ген DMY, разположен в Y хромозомата. Генотипният пол

▼ **M6**

на оризията може да бъде идентифициран чрез определяне на първичната структура на гена DMU от ДНК, извлечена например от парче анална перка или гръбна перка. Наличието на DMU показва XY (мъжки) индивид, независимо от фенотипа, докато липсата на DMU показва XX (женски) индивид, независимо от фенотипа (23). Насоки за приготвяне на тъканите и за метода с PCR са дадени в допълнение 9. Определянето на генетичния пол при триглата бодливка също се извършва чрез метод с PCR, описан в допълнение 10.

54. Проявата на междинен пол (за определение, вж. допълнение 1) следва да бъде протоколирана.

Вторични полови белези

55. При видове риби като японската оризия вторичните полови белези са под контрола на ендокринната система; поради това, ако е възможно, в края на експозицията следва да бъдат извършени наблюдения върху външния вид на рибата. При японската оризия образуването на гениталната папила в задната част на аналната перка при женските е чувствително към андрогени. В глава В.37 от настоящото приложение (38) са предоставени съответни снимки на мъжки вторични полови белези и на андрогенизирани женски индивиди.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Обработка на резултатите**

56. Важно е крайната точка да се определя с най-силния валиден статистически тест. Опитната единица е повторението, но варирането вътре в повторението трябва да бъде включено в статистическото тестване. Блокова схема на процедурата по вземане на решения е на разположение в допълнение 8, за подпомагане при избора на най-подходящия статистически тест за използване, въз основа на характеристиките на данните, получени от изпитването. Статистическото ниво на значимост е 0,05 за всички включени крайни точки.

Съотношения между половете и генетичен пол

57. Ако съществува монотонна зависимост доза-отклик, съотношенията между половете следва да бъдат анализирани за значимо въздействие (подход NOEC/LOEC) на експозицията с трендов тест на Йонкхере-Терпстра. Ако се установи, че зависимостта не е монотонна, следва да бъде приложен тест за сравнения по двойки: Ако могат да бъдат получени нормалност и хомогенна дисперсия, използва се тестът на Дънет. Ако дисперсията е хетерогенна, използва се тестът на Тамхане-Дънет. В другите случаи се използва точният тест на Ман-Уитни с корекция на Бонферони-Холм. Блокова схема с описание на статистиките на съотношенията между половете е дадена в допълнение 8. Съотношенията между половете следва да бъдат представени в таблици като концентрационни отношения \pm SD за мъжки, женски, междинен и недиференциран пол. Статистическата значимост следва да бъде подчертана. Примери са представени в доклада за валидиране на фаза 2 от ИРПР (42). Генетичният пол следва да се протоколира като процент на инверсия на фенотипния пол на индивидите от мъжки, женски, междинен и недиференциран пол.

Концентрации на VTG

58. Концентрациите на VTG следва да бъдат анализирани за значимо въздействие (подход NOEC/LOEC) на експозицията. Тестът на Дънет се предпочита пред t-теста с корекция на Бонферони. Когато се използва корекция на Бонферони, предпочита се корекция на Бонферони-Холм. Необходимо е да се предвиди лог-трансформация на VTG за постигане на нормалност и хомогенност на дисперсията. На следващо място, ако зависимостта концентрация-отклик е в съответствие с монотонността, тогава тестът на Йонкхере-Терпстра е за предпочитане пред всички горепосочени. Ако се използват t-тестове или тестът на Дънет, за продължаване на работата не е необходим F-тест за значимост при ANOVA. За подробности виж диаграмата в

▼ **M6**

допълнение 8. Резултатите следва да бъдат протоколирани в таблици като средни стойности на концентрациите \pm SD отделно за мъжки, женски, междинен и недиференциран пол. Статистическата значимост на фенотипните женски и фенотипните мъжки индивиди трябва да бъде ясно обозначена. Примери са представени в доклада за валидиране на фаза 2 от ИРПП (42).

Действителни концентрации на изпитвания химикал

59. Действителните концентрации на изпитвания химикал в камерите трябва да бъдат анализирани в честоти, описани в точка 34. Резултатите следва да се протоколират в таблици, като средна стойност на концентрацията \pm SD на база повторение, както и на база концентрация с ясно обозначени информация за броя на пробите и стойностите, силно различаващи се от нормалните за средната концентрация на третиране \pm 20 %. Примери могат да бъдат намерени в доклада за валидиране на фаза 2 от ИРПП (42).

Интерпретиране на резултатите

60. Резултатите от изпитването следва да се тълкуват внимателно, когато измерените концентрации на изпитвания химикал в разтворите за изпитване са на нива, които са близки до границата на откриване на метода за анализ.

Протокол от изпитването

61. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал

- Относими физични и химични свойства; данни за идентификация на химикала, включително чистота и аналитичен метод за количествено определяне на изпитвания химикал.

Условия на изпитването

- Използвана процедура за изпитване (например проточна или полустатична/с обновяване); планът на изпитването, включително концентрации на изпитване, метод на подготовка на изходните разтвори, честота на обновяване (трябва да са посочени средството за повишаване на разтворимостта и неговата концентрация, когато се използва такава);
- номиналната концентрация на изпитване, средните стойности на измерените величини и техните стандартни отклонения в камерите за изпитването, и методът, чрез който са получени (използваният метод за анализ трябва да бъде представен в приложение); доказателство, че измерванията се отнасят за концентрациите на изпитвания химикал в истински разтвор;
- качество на водата в камерите за изпитване: рН, твърдост, температура и концентрация на разтворен кислород;
- подробна информация за храненето (например вид на храната(ите), дадено количество и честота, и анализи за съдържание на замърсители, напр. полихлорирани бифенили, полициклични ароматни въглеводороди и органохлорни пестициди), ако е относимо.

Резултати

- Доказателство, че контролите съответстват на критериите за валидност: в таблиците данните за процента на излюпване следва да бъдат представени като процент на повторение и на концентрация. Стойностите, силно различаващи се от критериите за признаване (при контролите), следва да бъдат ясно посочени. Преживяването следва да бъде представено като процент на повторение и на концентрация. Стойностите, силно различаващи се от критериите за валидност (при контролите), следва да бъдат ясно посочени;
- Ясно посочване на резултатите, получени за различните наблюдения крайни точки: преживяване на ембриони и процент на излюпване; необичаен външен вид; дължина и тегло; измервания на VTG (ng/g хомогенат, ng/ml плазма или ng/mg черен дроб); хистология на гонадите, съотношение между половете, данни за

▼ M6

генетичния пол; проява на необичайни реакции от страна на рибите и всякакви видими въздействия, причинени от изпитвания химикал.

62. Резултатите трябва да бъдат представени като средни стойности \pm стандартно отклонение (SD) или стандартна грешка (SE). Статистиките следва да бъдат протоколирани най-малко като NOEC и LOEC и доверителни интервали. Следва да се спазва статистическата блокова схема (допълнение 8).

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test*, Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, and J.P. Sumpter, 1996, „Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals“, *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, pp. 194-202.
- (3) Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995, „Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment“, *Environmental Health Perspectives* 103, pp. 173-178.
- (4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix, and H. Trip (1999), „An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin“, *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, pp. 337-347.
- (5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen, and P. Bjerregaard (2001a), „Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*)“, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 130, pp. 119-131.
- (6) Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), „Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters“, *Fish Physiology and Biochemistry* 28, pp. 319-321.
- (7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren, and G.I. Petersen (2003), „Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone“, *Aquatic Toxicology* 65, pp. 397-411.
- (8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, and C.R. Tyler (2002), „Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances“, *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 319-326.
- (9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, and Z.J. Wang (2007), „Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults“, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 533-541.
- (10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V. Sullivan (1999), „Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds“, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 123, pp. 113-125.
- (11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, and J.M. Porcher (2002), „Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*)“, *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 1699-1708.
- (12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002), „Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin“, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 132, pp. 161-169.
- (13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B.E. Bengtsson (2004), „The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus*

▼ M6

- aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption — II — kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction“, *Aquatic Toxicology* 70, pp. 311-326.
- (14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), „Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka“, *Journal of Health Science* 50, pp. 301-308.
- (15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), „Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. *Aquatic Toxicology*“, 78, pp. 202-206.
- (16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), „Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)“, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, pp. 101-105.
- (17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S., Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), „Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)“, *Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597*, pp. 48-51.
- (18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), „Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening“, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, pp. 621-633.
- (19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), „Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone“, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, pp. 237-243.
- (20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), *Effects of Endocrine Disruptors on Sexual, Gonadal Development in Fish*, *Sexual Development* 3, pp. 136-151.
- (21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005), „An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*“, *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, pp. 1088-1098.
- (22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.
- (23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), „Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*“, *Developmental Dynamics* 231, pp. 518-526.
- (24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004), „Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations“, *Zoological Science* 21, pp. 613-619.
- (25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, and R.W. Flick (2007), „Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, pp. 8897-8901.
- (26) Palace, V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, and K.A. Kidd (2009), „Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethinylestradiol added to a whole lake“, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, pp. 1920-1935.
- (27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C.R. Tyler (2006), „Development of chronic tests for endocrine active chemicals — Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)“, *Aquatic Toxicology* 77, pp. 279-290.

▼ M6

- (28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), „Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)“, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 144, pp. 57-66.
- (29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004), „Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*)“, *Fish Physiology and Biochemistry* 30, pp. 257-266.
- (30) Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), „Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations“, *Aquatic Toxicology* 98, pp. 336-343.
- (31) Kiparissis, Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), „Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)“, *Aquatic Toxicology* 63, pp. 391-403.
- (32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and C.R. Tyler (2004), „Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development“, *Aquatic Toxicology* 70, pp. 11-21.
- (33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), „Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*)“, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 165-170.
- (34) Глава В.14 от настоящото приложение, Изпитване за растеж на ювенилни (полово незрели) риби.
- (35) Глава В.5 от настоящото приложение, Пълна биоразградимост.
- (36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
- (37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay*, Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (38) Глава В.37 от настоящото приложение, 21-дневно изследване на риби: Краткосрочен скрининг за естрогенна активност, андрогенна активност и потискане на ароматазата.
- (39) OECD (2012), *Fish Toxicity Testing Framework*, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris
- (40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (2007), „Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*“ *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 70, 9-10 pp 768-779.
- (41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paris.
- (42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paris.
- (43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paris.
- (44) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. OJ L 276, 20.10.2010, p. 33.

▼ M6*Допълнение 1***Съкращения и определения**

Апикална крайна точка: Причиняване на въздействие на равнище популация

ASV: Стойност на насищане при равновесие с атмосферния въздух

Биомаркер: Причиняване на въздействие на равнище индивид

Химикал: Вещество или смес.

Dph: Дни след излюпването

DMY: свързан с Y ген от домен DM, необходим за развитие на мъжки индивиди при оризията

ELISA: Ензимно-свързан имуносорбентен анализ

Тегло на риба: Мокро тегло на риба (след попиване)

ИРПР: Изпитване за развитие на пола при рибите

ос ХХГ: хипоталамус-хипофиза-гонадна ос

риба с междинен пол: Риба с наличие на повече от един овоцит в тестисите за 6 анализирани среза, или сперматогенни клетки в яйчиците (да/не)

Скорост на зареждане: Мокро тегло на рибите на обем вода

НД: Начин на действие

RT-PCR: Полимеразна верижна реакция с използване на обратна транскриптаза

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

риба с недиференциран пол: Риба с гонади, не проявяващи видими зародишни клетки.

VTG: Вителогенин

▼ M6

Допълнение 2

Опитни условия за ИРПР (сладководни видове)

1. Препоръчвани видове	Японска оризия (<i>Oryzias latipes</i>)	Зеброво данио (<i>Danio rerio</i>)	Тригла бодливка (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
2. Тип изпитване	Проточно или полустатично	Проточно или полустатично	Проточно или полустатично
3. Температура на водата	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Качеството на осветлението	Луминесцентни крушки (широк спектър)	Луминесцентни крушки (широк спектър)	Луминесцентни крушки (широк спектър)
5. Светлинен интензитет	10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 lux, или 50-100 ft-c (заобикалящи равнища на осветеност в лабораторията)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 lux, или 50-100 ft-c (заобикалящи равнища на осветеност в лабораторията)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 lux, или 50-100 ft-c (заобикалящи равнища на осветеност в лабораторията)
6. Период на осветеност:	12-16 h светлина, 8-12 h тъмнина	12-16 h светлина, 8-12 h тъмнина	16 h светлина, 8 h тъмнина
7. Минимални размери на камерата	Отделните камери следва да съдържат обем вода минимум 7 l	Отделните камери следва да съдържат обем вода минимум 7 l	Отделните камери следва да съдържат обем вода минимум 7 l
8. Обменени обеми на изпитвани разтвори	Най-малко 5 дневно	Най-малко 5 дневно	Най-малко 5 дневно
9. Възраст на изпитваните организми в началото на експозицията	Новооплодени хайверни зърна (стадий ранна бластула)	Новооплодени хайверни зърна (стадий ранна бластула)	Новооплодени хайверни зърна
10. Брой хайверни зърна на третиране	Минимум 120	Минимум 120	Минимум 120
11. Брой третираня	Минимум 3 (плюс подходящи контроли)	Минимум 3 (плюс подходящи контроли)	Минимум 3 (плюс подходящи контроли)
12. Брой повторения на третиране	Минимум 4 (освен при разпределяне към контролите с използване на корен квадратен)	Минимум 4 (освен при разпределяне към контролите с използване на корен квадратен)	Минимум 4 (освен при разпределяне към контролите с използване на корен квадратен)
13. Режим на хранене	Живи <i>Artemia</i> , замразени възрастни морски скариди, храна във вид на люспи и т.н. Препоръчително е храната да се дава два пъти дневно	Специална пържена храна, живи <i>Artemia</i> , замразени възрастни морски скариди, храна във вид на люспи и т.н. Препоръчително е храната да се дава два пъти дневно	Живи <i>Artemia</i> , замразени възрастни морски скариди, храна във вид на люспи и т.н. Препоръчително е храната да се дава два пъти дневно
14. Аериране	Няма, освен в случаите, когато концентрацията на разтворения кислород падне под 60 % насищане	Няма, освен в случаите, когато концентрацията на разтворения кислород падне под 60 % насищане	Няма, освен в случаите, когато концентрацията на разтворения кислород падне под 70 % насищане

▼ M6

15. Вода за разреждане	Чиста вода от повърхностни води, от кладенец или възстановена	Чиста вода от повърхностни води, от кладенец или възстановена	Чиста вода от повърхностни води, от кладенец или възстановена
16. Продължителност на експозицията на изпитвания химикал	60-dph	60-dph	60-dph
17. Биологични крайни точки	Процент на излюпване, преживяване, макроскопска морфология, VTG, хистология на гонадите, генетичен пол, съотношение между половете	Процент на излюпване, преживяване, макроскопска морфология, VTG, хистология на гонадите, съотношение между половете	Процент на излюпване, преживяване, макроскопска морфология, VTG, хистология на гонадите, съотношение между половете
18. Критерии за приемливост на изпитването за обединени повторения на контроли	Процент на излюпване > 80 %	Процент на излюпване > 80 %	Процент на излюпване > 80 %
	Преживяване след излюпването ≥ 70 %	Преживяване след излюпването ≥ 70 %	Преживяване след излюпването ≥ 70 %
	растеж (мокро тегло на риба, след попиване) > 150 mg	растеж (мокро тегло на риба, след попиване) > 75 mg	растеж (мокро тегло на риба, след попиване) > 120 mg
	Дължина (стандартна дължина) > 20mm	Дължина (стандартна дължина) > 14 mm	Дължина (стандартна дължина) > 20 mm
	Съотношение между половете (% мъжки или женски) 30 %-70 %	Съотношение между половете (% мъжки или женски) 30 %-70 %	Съотношение между половете (% мъжки или женски) 30 %-70 %

▼ M6

Допълнение 3

Химични характеристики на приемлива вода за разреждане

СЪСТАВКА	КОНЦЕНТРАЦИЯ
Твърди частици	< 20 mg/l
Общ органичен въглерод	< 2 mg/l
Нейонизиран амоняк	< 1 µg/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

▼ **M6**

Допълнение 4

От метода на изпитване В.14/Насоки относно концентрации на изпитване

Колона (брой на концентрациите между 100 и 10, или между 10 и 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Серия от три (или повече) последователни концентрации може да бъде избрана от една колона. Междинните точки между концентрациите в колона (x) се намират в колона (2x + 1). Изброените стойности могат да представят концентрации, изразени като обемен или тегловен процент (mg/l или µg/l). Стойностите могат да се умножават или делят на всички степени на 10, както е подходящо. Колона 1 може да се използва, ако е имало значителна неопределеност по отношение на нивото на токсичност.

▼ **M6***Допълнение 5***Насоки за хомогенизиране на главата и опашката от ювенилни екземпляри от зеброво данио, *Pimephales promelas*, тригла бодливка и японска оризия**

Целта на настоящия раздел е да се опишат процедурите преди количественото определяне на концентрацията на VTG. Могат да се използват други процедури, които водят до сравнимо количествено определяне на VTG. Като опция концентрацията на VTG може да се определи в кръвна плазма или черен дроб, вместо в хомогенат глава/опашка.

Процедура

1. Рибите се подлагат на анестезия и евтания в съответствие с описанието на изпитването.
2. Главата и опашката си изрязват от рибата в съответствие с описанието на изпитването. **Важно:** Всички инструменти за дисекция и плоскостта за разрязване трябва да се промият и почистят по подходящ начин (например с 96 % етанол) между обработването на всяка отделна риба, за да се предотврати „замърсяване с VTG“ от женски или индуцирани мъжки към неиндуцирани мъжки.
3. Теглото на обединените глава и опашка от всяка риба се измерва с точност до един mg.
4. След като се претеглят, частите се поставят в подходящи епруветки (напр. 1,5 ml епендорфова епруветка) и се замразяват при – 80 °C до хомогенизирането, или направо се хомогенизират върху лед с два пластмасови пестика. (Могат да се използват други методи, ако те се извършват върху лед и резултатът е хомогенна маса). **Важно:** *Епруветките следва да бъдат номерирани по подходящ начин, така че главата и опашката от рибата да могат да бъдат свързани с частта от тялото, останала след изрязването им и използвана за хистология на гонадите.*
5. Когато се достигне до хомогенна маса, се добавя леденостуден **буфер за хомогенизиране** (*) в количество, равно на 4-10 пъти теглото на тъканта (отбелязва се разреждането). Продължава се работата с пестиците, докато сместа стане хомогенна. **Важна забележка:** *За всяка риба се използват нови пестици.*
6. Пробите се поставят върху лед до центрофугирането при 4 °C на 50 000 g за 30 min..
7. Използва се пипета за поставяне на порции от 20 до 50 µl супернатант (отбелязва се количеството) в **поне две** епруветки, чрез потапяне на върха на пипетата под слоя мазнини на повърхността, и внимателно изсмукване на супернатантата, без фракции от мазнини или пелети.
8. Епруветките се съхраняват при – 80 °C до момента на употребата.

(*) *Буфер за хомогенизиране:*

50 mM TRIS хидрохлорид pH 7,4; 1 % смес от инхибитори на протеаза (Sigma); 12 ml TRIS хидрохлорид pH 7,4 + 120 µl смес от инхибитори на протеаза (или равностойни смеси от инхибитори на протеаза).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Смес от инхибитори на протеаза: От Sigma (за тъкани от бозайници)
Продуктов номер **P 8340**.

Бележка: Буферът за хомогенизирането следва да се използва на същия ден, в който е приготвен. По време на употреба се поставя върху лед

▼ M6

Допълнение 6

Насоки за количествено определяне на вителогенин в хомогенат глава/опашка при зеброво данио (*Danio rerio*) (с изменение от Holbech et al., 2001). могат да бъдат използвани други процедури, използващи хомоложни антитела и стандарти

1. Микротитърни плаки (сертифицирани Maxisorp F96, Nunc, Roskilde Denmark), предварително покрити с 5 µg/ml IgG срещу липовителин от зеброво данио се размразяват и се промиват 3 пъти с буфер за промиване (*).
2. Пречистен стандарт от вителогенин от зеброво данио ⁽¹⁾ се разрежда в поредица до 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 и 20 ng/ml в буфер за разреждане (***) и проби се разреждат поне 200кратно (за предотвратяване на матричния ефект) в буфер за разреждане и се поставят на плаките. Контрола за изследването се извършва в две повторения. Към всяко гнездо се прилагат 150 µl. Стандартите се прилагат в две повторения, а пробите — в три повторения. Инкубирането се извършва през нощта при 4 °C на клатачна машина.
3. Плаките се промиват 5 пъти с буфер за промиване (*).
4. HRP, свързан към верига от декстран (напр. AMDEX A/S, Denmark) и конюгираните антитела се разреждат в буфер за промиване; Действителното разреждане се различава в зависимост от партидата и възрастта. Към всяко гнездо се прилагат 150 µl и плаките се инкубират в продължение на 1 час при стайна температура върху клатачна машина.
5. Плаките се промиват 5 пъти с буфер за промиване (*) и дъното им се почиства внимателно с етанол.
6. Към всяко гнездо се прилагат 150 µl TMB plus (***). Плаките се защитават от светлина с калаено фолио плаката и се следи за промяна на оцветяването върху клатачна машина.
7. Когато стандартната крива е напълно оформена, ензимната активност се прекратява с добавяне на 150 µl 0,2 M H₂SO₄ към всяко гнездо.
8. Абсорбцията се измерва при 450 nm (напр. с четец за плаки ThermoMax на Molecular Devices. Данните се анализират със съответния софтуер (напр. Softmax).

(*) Буфер за промиване:

PBS-изходен (****)	500,0	ml
BSA	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Стойността на рН се коригира до 7,3 и се допълва до 5 l с H₂O, филтрувана през микропорест филтър. Съхранява се при 4 °C.

(**) Буфер за разреждане:

PBS-Изходен (****)	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Стойността на рН се коригира до 7,3 и се допълва до 1 l с H₂O, филтрувана през микропорест филтър. Съхранява се при 4 °C.

(***) TMB Plus е „готов за употреба“ субстрат, произведен от KemEnTec (Дания). Той е чувствителен към светлина. Съхранява се при 4 °C.

⁽¹⁾ Battelle AP4.6.04 (1.18 mg/ml (AAA)), пречистен по: Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. *Ecotoxicology* 8: 385-398.

▼ M6

(****) PBS изходен

NaCl	160,0	g
KH ₂ PO ₄	4,0	g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	26,6	g
KCl	4,0	g

Стойността на рН се коригира до 6,8 и се допълва до 2 l с H₂O, филтрувана през микропорест филтър. Съхранява се при стайна температура.

▼ **M6***Допълнение 7***Насоки за приготвяне на тъканни срезове за определяне на пола и на етапите при гонадите**

Целта на настоящия раздел е да се опишат процедурите преди оценката на хистологичните срезове. Могат да бъдат използвани други процедури, които водят до подобно определяне на пола и на етапите при гонадите.

С няколко изключения, тези процедури са сходни за японската оризия и зебровото данио.

Евтаназия, аутопсия и фиксиране на тъкани*Цели:*

1. Гарантиране на умъртвяването на рибите по хуманен начин.
2. Получаване на необходимите телесно тегло и измервания.
3. Оценка на вторичните полови белези.
4. Извършване на дисекция на тъкани за анализ на VTG.
5. Фиксиране на гонадите.

Процедури:

1. Умъртвяването на рибите трябва да се извършва непосредствено преди аутопсията. Поради тази причина не трябва да се умъртвяват множество риби едновременно, освен ако не са налице множество просектори.
2. С използване на кепче рибата се отстранява от камерата за изпитване и се пренася до зоната за аутопсия в съд за транспорт.
3. Рибата се поставя в разтвора за евтаназия. Рибата се отстранява от разтвора когато се преустанови дишането и тя не реагира на външни дразнителни.
4. Установява се мокрото тегло на рибата.
5. За приготвянето на тъканите за анализ на VTG рибата може да бъде поставена на коркова плоскост върху поставката на стереомикроскоп.
 - а. при зебровото данио главата се разрязва непосредствено зад коремната перка, а опашката се разрязва непосредствено зад гръбната перка.
 - б. при японската оризия коремът се отваря чрез направена внимателно инцизия, която се простира по коремната средна линия от гръдния пояс до точка, разположена точно краниално от ануса. Черният дроб се отстранява внимателно, като се използват малки пинсети и малка ножичка.
6. Екземплярите за анализ на VTG се поставят в епендорфови епруветки и незабавно се замразяват в течен азот.
7. Трупът, включително гонадите, се поставя в предварително етикетирани пластмасова касета за тъкани, която се прехвърля във фиксатор на Davidson или на Bouin. Обемът на фиксатора следва да бъде най-малко 10 пъти по-голям от приблизителния обем на тъканите. Съдът с фиксатора леко се разклаща в продължение на пет секунди за отстраняване на мехурчетата въздух от касетата.
8. а. Всички тъкани престояват във фиксатора на Davidson през нощта, след което на следващия ден се прехвърлят в отделни съдове с 10 %-ен неутрален буферизиран формалин. Съдовете с касетите се разклащат леко за 5 сек, за да се осигури достатъчно проникване на формалина в касетите.

▼ M6

- б. Тъканите престояват във фиксатора на Bouin в продължение на 24 часа, след което се прехвърлят в 70 % етанол.

Обработка на тъканите*Цели:*

1. Тъканите се дехидратират с цел достатъчно проникване на парафин.
2. Тъканта се пропива с парафин за запазване на нейната цялост и за образуване на здрава повърхност за микротомия.

Процедури:

3. Етикетираниите касети с тъкани се изваждат от съхранението във формалин/етанол и се поставят в кошница(и) за обработка. Кошницата за обработка се зарежда в тъканния процесор.
4. Избира се график за обработката.
5. След приключването на цикъла на обработка от тъканния процесор тъканта обработващият лични данни е завършил цикъл за обработка, кошницата (или кошниците) може да се прехвърли към станцията за включване в парафин.

Включване*Цел:*

Екземплярът се ориентира правилно във втвърдения парафин за микротомия.

Процедури:

1. Кошницата (или кошниците) с касети се изважда от процесора и се потапя в напълнената с парафин предна камера на термичната конзола на станцията за включване в парафин или касетите се преместват в отделен апарат за подгряване за парафин.
2. Първата касета, която трябва да бъде включена, се отстранява от предната камера на термичната конзола или от апарата за подгряване за парафин. Капакът на касетата се отстранява и изхвърля, и етикетът на касетата се проверява насрещно със записите за животинския екземпляр, за разрешаване на евентуални несъответствия преди включването.
3. Избира се матрица с подходящ размер за включването.
4. След това матрицата се поставя под мястото на подаване на дозиращата конзола и се запълва с разтопен парафин.
5. Екземплярът се отстранява от касетата и се поставя в разтопения парафин в матрицата. Това се повтаря с 4-8 екземпляра за всяка парафинова матрица. Позициите на отделните риби се маркират чрез поставянето на риба № 1 на 180 градуса от риби 2-4/8.
6. Добавя се допълнително парафин за покриване на екземпляра.
7. Матрицата с основата на касетата се поставя върху охлаждащата плоча на крио конзолата.
8. След втвърдяването на парафина блокчето (т.е. втвърденият парафин, съдържащ тъканите и основата на касетата) се отстранява от матрицата.

Микротомия*Цел:*

Да се разрежат и приготвят хистологични срезове за оцветяване.

Процедури:

1. Началната фаза на микротомията, наречена „facing“ се извършва, както следва:
 - а. Парафиновото блокче се поставя в държача за образци на микротомата.
 - б. Държачът за образци се придвижва чрез въртене на колелото на микротомата и от парафиновата повърхност на блока се изрязват дебели срезове докато ножът достигне включените тъкани.

▼ **M6**

- в. Дебелината на среза на микротомата се настройва между 3-5 микрона. Държачът за образци се придвижва и от блокчето се отрязват множество срезове, за да се отстранят всички артефакти, създадени върху срязаната повърхност на тъканта по време на грубото обрязване.
- г. Блокчето може да бъде отстранено от държача за образци и поставено върху лед с лицето надолу за намокряне на тъканта.
2. Следващата фаза на микротомията е окончателното срязване и поставянето на тъканните срезове върху предметни стъкла. Тези процедури се извършват, както следва:
- а. Ако блокчето е било поставено върху лед, то се отстранява от леда и се поставя обратно в държача за образци на микротомата.
- б. С дебелина на среза на микротомата, настроена на 3-5 микрона, държачът за образци се придвижва чрез въртене на колелото на микротомата. Правят се срезове от блока до получаването на „лента“, съдържаща поне един приемлив срез, включващ гонадите. (При необходимост, по време на срязването блокчето може да бъде отстранено от държача за образци и поставено върху лед за намокряне на тъканта, и после поставено обратно в държача за образци.)
- в. Срезове се оставят за изправяне да плуват върху водната повърхност във водната баня. Прави се опит да се получи най-малко един срез, който не съдържа гънки и няма въздушни мехурчета, попаднали под него.
- г. Предметно стъкло за микроскоп се потапя под най-добрия срез, който се изважда от водата чрез повдигане нагоре с предметното стъкло. Този процес се нарича „монтиране“ на среза върху предметното стъкло.
- д. Приготвят се три среза за набор от риби. Вторият и третият срез се правят на интервали 50 микрона след първия. Ако рибите не са включени с техните гонади на същото ниво на срязването, трябва да се направят повече срезове, за да се гарантира, че от всяка риба са получени най-малко шест среза, включващи гонадите.
- е. Със средство за надписване на предметни стъкла номерът на блокчето, от който е било приготвено предметното стъкло, се записва върху предметното стъкло.
- ж. Предметното стъкло се поставя на поставка за оцветяване.
- з. Блокчето се отстранява от държача за образци и се поставя с лицето надолу за съхранение.

Оцветяване, поставяне на покривно стъкло и етикетирание на предметното стъкло*Цели:*

- Оцветяват се срезове за хистопатологично изследване
- Постоянно се запечатват монтираните и оцветени тъкани.
- Постоянно се идентифицират оцветените срезове раздели по начин, който позволява пълна проследимост.

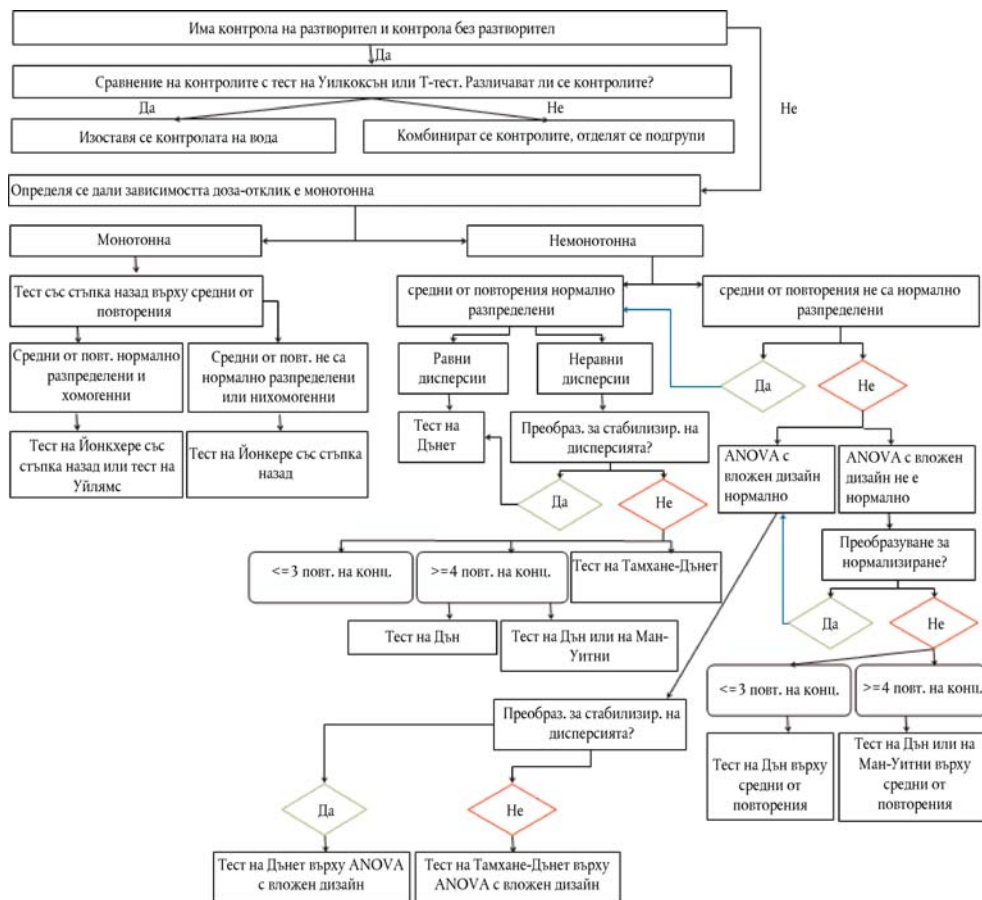
Процедури:

1. Оцветяване
 - а. Предметните стъкла се изсушават на въздух през нощта преди оцветяването.
 - б. Срезове се оцветяват с хематоксилин-еозин.
2. Поставяне на покривно стъкло
 - а. Покривното стъкло може да се поставя ръчно или автоматично.
 - б. Предметното стъкло се потапя в ксилен или TissueClear и излишъкът от ксилен/TissueClear леко се изхвърля от предметното стъкло.

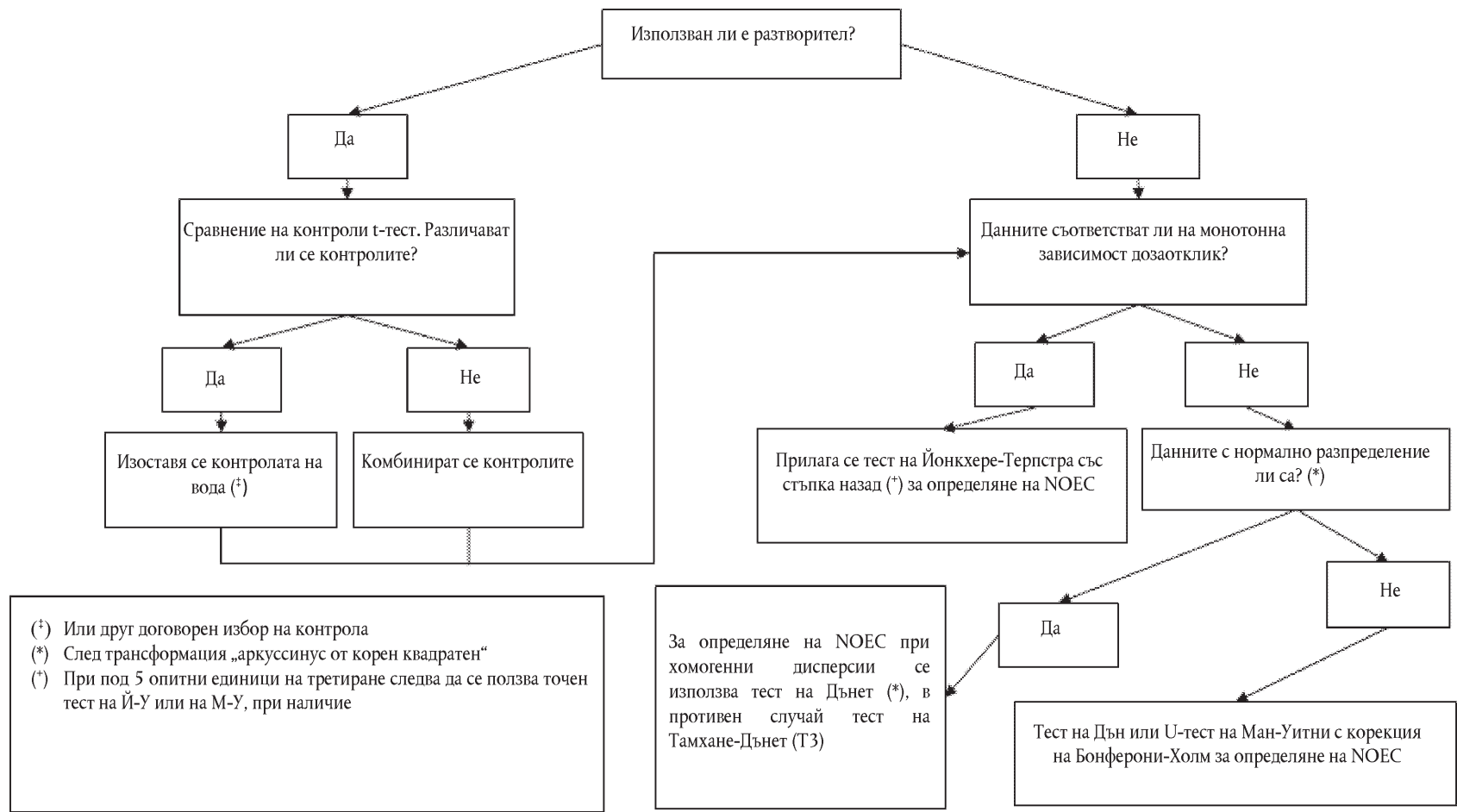
▼ **M6**

- в. Приблизително 0,1 ml от средата за монтиране се прилага в близост до края на предметното стъкло, противоположен на матирания край, или на покривното стъкло.
 - г. Покривното стъкло се слага под малък ъгъл при поставянето му върху предметното стъкло.
3. Етикетиране
- а. Всеки етикет на предметно стъкло следва да включва следната информация.
 - i. Наименование на лабораторията
 - ii. Биологичен вид
 - iii. Екземпляр №/предметно стъкло №
 - iv. Химикал/Гретирана група
 - v. Дата

Статистическа блокова схема при анализ на вителогенин



Статистическа блокова схема при анализ на съотношението между половете



▼ **M6***Допълнение 9***Насоки за вземане на тъканни проби за определяне на генетичния пол и за определяне на генетичния пол чрез метод с PCR****Вземане на тъканни проби, приготвяне и съхранение преди определяне на генетичния пол чрез метод с PCR при оризия (изготвено от Лабораторията по водни организми на Bayer CropScience AG)**

1. От всяка отделна риба с тънка ножица се отрязва аналната или гръбната перка и се поставя в епруветка, напълнена с 100 µl буфер за извличане 1 (подробности за приготвянето на буфера са дадени по-долу). Ножиците се почистват след всяка отделна риба в бехерова чаша, напълнена с дестилирана H₂O, и се изсушават с абсорбираща хартия.
2. Тъканта на перката се хомогенизира с тefлонов пестик за микроепруветки за лизис на клетките. За всяка епруветка се използва нов пестик за предотвратяване на всякакво замърсяване. Пестиците се поставят за престояване до следващия ден в 0,5 M NaOH, изплакват се в продължение на 5 минути в дестилирана H₂O и до използването се съхраняват в етанол или в стерилна среда след автоклавиране.
3. Възможно е също така тъканта от перка да се съхранява без буфер за извличане 1, поставена върху сух лед и след това в хладилник при – 80 °C, за да се предотврати всякакво разграждане на ДНК. Но извличането функционира по-добре, ако извличането на ДНК е по същото време (за обработка вж. по-горе; пробите трябва да се размразят върху лед след съхранение при температура – 80 °C преди поставянето на буфера в епруветките).
4. След хомогенизирането всички епруветки се поставят на водна баня и се загряват в продължение на 15 минути при 100 °C.
5. След това 100 µl от буфер за извличане 2 (подробности за приготвянето на буфера са дадени по-долу) се добавят с пипета във всяка епруветка. Пробите се съхраняват на стайна температура в продължение на 15 минути, като от време време леко се разклащат с ръка.
6. След това всички епруветки се поставят отново на водна баня и отново се загряват в продължение на 15 минути при 100 °C.
7. До последващия анализ епруветките се замразяват при – 20 °C.

Подготовка на буфер

буфер 1 за PCR:

500 mg N-лауроилсаркозин (напр. Merck KGaA, Darmstadt, GE)

2 ml 5M NaCl

добавя се 100 ml дест. H₂O

→ Автоклав

буфер 2 за PCR:

20 g Chelex (напр. Biorad, Munich, GE)

обемът се увеличава в 100 ml дест. H₂O

→ Автоклав

Определяне на генетичния пол (чрез метод с PCR) при оризия (изготвено от Лабораторията по водни организми на Bayer CropScience AG и Universität Würzburg Biozentrum)

Пригответените и замразените епруветки (описани в горния раздел) се размразяват върху лед. След това те се центрофугират с помощта на центрофуга Епендорф (30 секунди на максимална скорост, при стайна температура). За PCR се използва чистият супернатант, отделен от утайката. Следва абсолютно да се избягва прехвърлянето в PCR на всякакви следи от Chelex (локализиран в утайката), тъй като това ще пречи на активността на Taq полимеразата. Супернатантът се използва пряко или може да се съхранява замразяван (при – 20 °C) и след това размразяван отново в няколко цикъла без отрицателно въздействие върху ДНК за последващи анализи.

▼ **M6**

1. Приготвяне на „реакционна смес“ (25 µl на проба):

	Обем	Крайна концен-трация
Исходна ДНК	0,5 µl-2 µl	
10x буфер за PCR с MgCl ₂	2,5 µl	1 x
Нуклеотиди (всеки от dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mM)	200 µM
Начален праймер (10 µM) (вж. по-долу 3-5)	0,5 µl	200 nM
Обратен праймер (10µM) (вж. по-долу 3-5)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Вода (с чистота за PCR)	до 25 µl	
Taq E полимераза	0,3 µl	1,5 U

10x буфер за PCR с MgCl₂: 670 mM TRIS хидрохлорид (pH 8,8 при 25 °C), 160 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM MgCl₂, 0,1 % Tween 20

За всяка PCR (вж. по-долу 3-5) са необходими специалният праймер като нова комбинация от „реакционна смес“ и достатъчно необходимо количество изходна ДНК за всяка проба (вж. по-горе). Съответните количества се прехвърлят в нови епруветки чрез пипети. След това всички епруветки се затварят, разбъркват (приблизително 10 секунди) и центрофугират (10 секунди, на стайна температура). В този момент могат да бъдат започнати съответните PCR програми. Допълнително във всяка PCR програма се използват положителна контрола (примерна проба ДНК с известна активност и ясни резултати) и отрицателна контрола (1 µl дест. H₂O)

2. Приготвяне на гела от агароза (1 %) — по време на изпълняващи се PCR програми:

- Разтварят се 3 g агароза в 300 ml 1 × TAE буфер (1 % агарозен гел)
- Този разтвор трябва да се изварява с използване на микровълнова фурна (около 2-3 мин.)
- Горещият разтвор се прехвърля, като се налива в специална поставка, която се намира върху лед.
- След около 20 минути агарозният гел е готов за ползване
- Агарозният гел се съхранява в 1x TAE буфер до края на PCR програмите

3. PCR програма за актин:

Тази PCR цели да се покаже, че ДНК в пробата не е увредена.

- Специален праймер:

„Mact1(upper/forward)“ → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

„Mact2(lower/reverse)“ → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

- Програма:

5 min 95 °C

Цикъл (35 пъти):

Денатуриране → 45 sec при 95 °C

Хибридизация → 45 sec при 56 °C

Удължаване → 1 min при 68 °C

15 min 68 °C

▼ **M6**4. *PCR програма за X- и Y-гени:*

Пробите с интактна ДНК се използват при тази PCR програма за откриване на X- и Y-гени. Мъжката ДНК следва да показва една двойна лента, а женската ДНК следва да показва една единична лента (след оцветяване и гелна електрофореза). В изпълнението на тази програма следва да се включат една положителна контрола за мъжки (XY проба) и една за женски (XX проба).

— Специален праймер:

„PG 17.5“ (upper/forward) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

„PG 17.6“ (lower/reverse) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Програма:

5 min 95 °C

Цикъл (40 пъти):

Денатуриране → 45 sec при 95 °C

Хибридизация → 45 sec при 55 °C

Удължаване → 1 min 30 sec при 68 °C

15 min 68 °C

5. *PCR програма за Y-ген като „контрола“ за PCR програмата за X- и Y-ген:*

Тази PCR програма проверява резултатите от „PCR програмата за X- и Y-ген“. „Мъжките проби“ следва да показват една лента, а „женските проби“ не трябва да показват никаква лента (след оцветяване и гелна електрофореза).

— Специален праймер:

„DMTYa (upper/forward)“ → GGC CGG GTC CCC GGG TG

„DMTYd (lower/reverse)“ → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Програма:

5 min 95 °C

Цикъл (40 пъти):

Денатуриране → 45 sec при 95 °C

Хибридизация → 45 sec при 56 °C

Удължаване → 1 min при 68 °C

15 min 68 °C

6. *Оцветяване на PCR проби:*

Оцветяващ разтвор:

50 % глицерол

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 % Бромфенолово синьо

0,25 % Ксиленцианол

Отмерва се с пипета 1 µl от оцветяващия разтвор във всяка отделна епруветка

7. *Начало на гелната електрофореза:*

— Приготвеният 1 %-ен агарозен гел се прехвърля в контейнер за гелна електрофореза, напълнен с 1 × TAE буфер.

— Обем от 10 — 15 µl от всяка оцветена PCR проба се добавя с пипета в улей за агарозния гел

— Също така, 5 — 15 µl от 1kb-„Ladder“ (Invitrogen) се добавя с пипета в отделен улей

— Начало на електрофорезата с 200 V

— Прекратяване след 30-45 min

▼ **M6**

8. *Определяне на лентите:*

- Агарозният гел се почиства в дестилирана H_2O
- След това агарозният гел се прехвърля в етидиев бромид за 15-30 min
- След това следва да се заснеме изображение на агарозния гел в UV кутия
- Накрая пробите се анализират в сравнение с лентата с положителна контрола (или ленти) и маркера.

▼ **M6***Допълнение 10***Насоки за вземане на тъканни проби от тригла бодливка за определяне на генетичния пол чрез метод с PCR****Вземане на тъканни проби и извличане на ДНК**

ДНК може да бъде извлечена посредством различни достъпни в търговската мрежа реактиви и както с ръчни, така и с автоматични системи за извличане. Протоколът, използван в Cefas Weymouth Laboratory е изложен по-долу, а където е уместно, са добавени алтернативните подходи.

1. От всяка отделна риба с тънка ножица се отстранява малка част от тъкан (10-20 mg) от дорзолатералната област (след отстраняване на главата и опашката за анализ на VTG). Тъканта се слага в епруветка, след което или се поставя директно в течен азот (за съхранение при – 80 °C), или се напълва с 70 % етанол (за транспортиране и последващо съхраняване при 4 °C). Ножицата се почиства след всяка отделна риба в 70 % етанол, след това в дестилирана вода, и се изсушава с абсорбираща хартия.
2. Етанолът (ако е наличен) се отстранява чрез аспирация и тъканта се разгражда до следващия ден с протеиназа K в 400 µl ATL буфер (Qiagen). Една аликвотна част (200 µl) от разградената тъкан се прехвърля в 96-гнездов S-блок (Qiagen) и ДНК, извлечена в 96-гнездови формат с Qiagen Universal BioRobot и комплект QIamp Investigator BioRobot. ДНК се елуира в 50 µl вода, несъдържаща дезоксирибонуклеази и рибонуклеази. Ако се използват твърди тъкани за извличане на ДНК (например гръбнак или гръдна перка), може да се окаже необходимо да се хомогенизира пробата в лизиращ буфер, като се използва устройство за лизис на тъкани FastPrep® или еквивалентна система за разрушаване на тъканната структура.

Алтернативно,

- а) а) тъканта се разгражда до следващия ден с протеиназа K в 400 µl G2 лизиращ буфер (Qiagen) и ДНК се извлича от 200 µl от разградения материал се подлага на преглед чрез използването на комплект EZ-1 DNA easy tissue и EZ-1 biorobot, или миникомплект DNA easy tissue. ДНК се елуира в 50 µl обем.
- б) Тъканите се обработват с помощта на реактив DNAzol. За кратко време тъканните проби се лизират в 1 ml DNAzol в продължение на 10 min в микроцентрифужна епруветка от 1,5 ml и след това се центрофугират при 13 000 rpm в продължение на 5 минути, за да се отстранят всякакви твърди частици. След това лизираната проба се прехвърля в нова микроцентрифужна епруветка от 1,5 ml, съдържаща 500 µl 100 % етанол с чистота „за молекулярна биология“ и след това се центрофугира при 13 000 rpm в продължение на 10 минути, за да се утаи ДНК. Етанолът се отстранява и се заменя с 400 µl 70 % етанол, центрофугира се при 13 000 оборота в минута в продължение на 5 минути и ДНК пелетата се разтваря в 50 µl вода с чистота „за молекулярна биология“, несъдържаща дезоксирибонуклеази и рибонуклеази. Отново, при използване на твърди тъкани (гръдна перка), преди извличане на ДНК може да се окаже необходимо да се хомогенизира пробата в лизиращ буфер, като се използва устройство за лизис на тъкани FastPrep® или еквивалентна система за разрушаване на тъканната структура.

3. ДНК се съхранява при – 20 °C, докато стане необходима.

Важна забележка: по време на процедурите трябва да бъдат носени ръкавици.

Анализ с полимеразна верижна реакция (PCR)

Извършени са амплификации с използване на 2,5 µl ДНК екстракт в 50 µl реакционен обем чрез използване на Idh locus-специфични праймери (както е описано от Peichel et al., 2004. Current Biology 1:1416-1424):

Начален праймер	5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'
Обратен праймер	5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

▼ **M6**

Съществуват множество доставчици на подходящи PCR реактиви. Методът, изложен по-долу, е използваният понастоящем в Cefas Weymouth Laboratory.

1. *Приготвяне на „реакционна смес“ (50 µl на проба):*

Mastermix се приготвя, както следва. Тя може да бъде приготвена предварително и да се съхранява замразена при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, докато стане необходима. Приготвя се достатъчно Mastermix за отрицателна контрола (само вода с чистота „за молекулярна биология“).

	Обем (изходна конц.)/ проба)	Крайна концентрация
5xGoTaq® реакционен буфер	10 µl	1x
MgCl ₂	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Нуклеотиди (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM всеки)	250 µM всеки
Начален праймер	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Обратен праймер	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
вода с чистота „за молекулярна биология“	30,75 µl	
GoTaq полимераза	0,25 µl	1,25 U

— Поставят се 47,5 µl в етикетирана тънкостенна епруветка за PCR от 0,5 ml.

— Добавят се 2,5 µl от пречистената ДНК към подходящо етиктираната епруветка. Повтаря се за всички проби и за отрицателната контрола.

— Покрива се с 2 капки минерално масло. Като алтернатива се използва термоциклер със загрят капак.

— Капаците се затварят.

— Пробите са били денатурирани в термоциклер Peltier PTC-225 при $94 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ в продължение на 5 минути, последвани от 39 цикъла на $94 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ в продължение на 1 минута, при $55 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ в продължение на 1 минута, при $72 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ в продължение на 1 минута, и окончателно удължаване при $72 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ в продължение на 10 минути.

2. *Приготвяне на агарозния гел (2 %):*

Традиционно PCR продуктите се разделят върху 20 % агарозен гел, съдържащ етидиев бромид.

Могат също да се използват капилярни системи за електрофореза.

— Претеглят се 2 g агароза в 100 ml $1 \times$ TAE буфер

— Загрива се в микровълнова фурна (прибл. 2-3 мин.) за разтваряне на агарозата.

— Добавят се 2 капки етидиев бромид с крайна концентрация 0,5µg/ml

— Горещият разтвор се прехвърля в оборудване за наливане на гел.

— Дава се възможност за втвърдяване на гела

3. *Гелна електрофореза:*

— Агарозният гел се прехвърля в уреда за електрофореза и се потапя в $1 \times$ TAE буфер

— Поставят се 20 µl от всяка проба в отделно гнездо, като се добавя маркер за молекулно тегло (100bp DNA ladder, Promega) в свободно гнездо.

— Електрофорезата се провежда при 120 V за 30-45 минути.

▼ **M6**

4. *Визуализиране на продуктите от амплификацията*

Ако, както е описано по-горе, в агарозния гел е бил включен етидиев бромид, продуктите от ДНК стават видими под източник на ултравиолетови лъчи. Като алтернатива агарозният гел се оцветяват чрез покриване на гела в разреден разтвор на етидиев бромид (0,5 µg/ml във вода) за 30 минути преди визуализацията.

▼ **M6***Допълнение 11***Насоки за процедура за изкуствено оплождане за тригла бодливка**

Целта на настоящия раздел е да се опишат процедурите за получаване на оплоден хайвер от тригла бодливка с оглед на използването му в ИРПР.

Процедури

Получаване на сперма от мъжки индивиди

1. Подлага се на евтаназия добре оцветен мъжки индивид от желаната популация.
2. Извършва се дисекция на тестисите от всяка страна на рибата. *Тестисите по принцип са силно пигментирани пръчковидни структури, които са лесно забележими на страничната линия на тялото.* Използва се един от следните методи:
3. С използване на чифт тънки ножици се започва от клоаката и се прави 1-1,5 cm инцизия с едно срязване под ъгъл от около 45 градуса.
4. Използва се скалпел за извършване на малка инцизия странично на рибата, леко задно от таза и точно вентрално на костните пластинки.
5. Тестисите се отстраняват чрез тънки пинсети и се поставят в блюдо на Петри.
6. Всеки тестис се покрива със 100 µl прясно приготвен **краен разтвор на Hank** ⁽¹⁾.
7. Тестисите се нарязват на фини кубчета с помощта на бръснарско ножче или скалпел. Това освобождава сперматозоиди и придава на разтвора на Hank вид на мляко.
8. Течността, съдържаща спермата, се добавя в епруветка, като същевременно се внимава да не се включват никакви парчета тъкан от тестиси при пипетирането.
9. Обем от 800 µl краен разтвор на Hank се добавят в епруветката и се смесват добре.
10. Ако е необходимо, мъжкият екземпляр може да бъде съхранен чрез фиксиране в 100 % етанол или друг желан фиксатор. Това е особено важно, ако при проучването се определят родителите на поколението.

Важна забележка: *Въпреки че повечето от изискваните изходни разтвори могат да бъдат приготвени предварително, изходен разтвор 5 и впоследствие крайният разтвор следва да бъдат приготвени свежи в деня на употребата.*

Изходен разтвор 1

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Дестилирана вода (дест.в.)	100 ml

Изходен разтвор 2

Na ₂ HPO ₄ (безводен)	0,358 g
KH ₂ PO ₄	0,60 g
дест.в.	100 ml

Изходен разтвор 3

CaCl ₂	0,72 g
дест.в.	50 ml

⁽¹⁾ Буфериран физиологичен разтвор на Hank (HBSS):

HBSS е необходим за съхраняване на спермата по време на подготовката за оплождането.

▼ **M6****Изходен разтвор 4**

MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,23 g
дест.в.	50 ml

Изходен разтвор 5 (прясно приготвен)

NaHCO ₃	0,35 g
дест.в.	10 ml

Забележка: Ако някои от горните соли са налични, но са с различно съдържание на вода (т.е., 2H₂O вместо безводен), те все пак могат да се използват, но първо се коригира теглото въз основа на молекулното тегло).

За крайния разтвор на Hank се комбинират в следния ред:

Изходен разтвор 1	1,0 ml
Изходен разтвор 2	0,1 ml
Изходен разтвор 3	0,1 ml
дест.в.	8,6 ml
Изходен разтвор 4	0,1 ml
Изходен разтвор 5	0,1 ml

Разбърква се добре преди използване.

Оплождане

1. В желаната популация се идентифицират едри женски екземпляри със зрял хайвер; Женските индивиди са готови за манипулация с цел хвърляне на хайвер само когато се виждат хайверни зърна, издадени от клоаката. Женските индивиди имат характерна поза „с главата нагоре“.
2. Леко се прокаква пръст или палец от едната страна на рибата по продължение на тялото към опашката, за стимулиране на хвърлянето на хайвер в новоприготвено блюдо на Петри. Същото се повтаря от другата страна на рибата и тя се връща откъдето е взета.
3. Хайверът може да бъде разпръснат (така, че да образува монослой) с използване на фина четка. Важно е да се направи опит за излагане на максимален брой хайверни зърна на спермата, поради което максималното увеличаване на площта им е от полза. Важна забележка: Хайверът се съхранява във влажно състояние чрез поставяне на влажна тъкан около него (важно е хайверът да не докосва водата пряко, тъй като това може да доведе до преждевременно втвърдяване на хориона и да попречи на оплождането). Съществува голямо вариране в броя на хайверните зърна, които могат да бъдат получени от всяка женска, но като средна стойност следва да бъде лесно от един единствен женски индивид със зрял хайвер да се получат около 150 хайверни зърна.
4. 25µl сперма в смес на Hank се разпределя равномерно по цялата повърхност на хайвера с използване на четката. Хайверните зърна бързо се втвърдяват и променят цвета си (в рамките на една минута) след започване на оплождането. Ако очакваният брой на хайверните зърна е над 150, процедурата се повтаря. По подобен начин, ако хайверните зърна не се втвърдяват в рамките на една минута, добавя се малко повече сперма. Важна забележка: Добавянето на повече сперма не подобрява непременно процента на оплождане.
5. Хайверните зърна и спермата следва да бъдат оставени да „взаимодействат“ в продължение най-малко на 15 минути и оплодените хайверни зърна следва да бъдат поставени в аквариумите за експозиция в рамките на 1,5 часа след оплождането.
6. Процедурата се повтаря, като се използва друга женска, до събирането на желания брой хайверни зърна.
7. Няколко хайверни зърна от последната партида се отделят и се фиксират в 10 % оцетна киселина.

▼ M6**Преброяване и разпределяне на хайверните зърна в аквариумите за изпитване**

1. Хайверните зърна трябва да бъдат равномерно разпределени между всяко ниво на третиране, за да се избегне отклонение в генетично отношение. Всяка партида от оплодени хайверни зърна следва да се раздели на равни по численост групи (на брой колкото нивата на третиране) с помощта на тъп инструмент (т.е., ентомологични пинсети с широк край или с използването на примка за инокулиране). Ако целта е 4 повторения на третиране, с 20 хайверни зърна във всяко, трябва да се разпределят 80 хайверни зърна в аквариум за експозиция. Важна забележка: Препоръчително е да се добавят допълнителни 20 % (т.е., 96 хайверни зърна при всяко ниво на третиране), за да е сигурно, че е получено 100 % оплождане.
2. Хайверът на бодливката е много податлив на гъбични инфекции извън пазеното от мъжкия гнездо. Във връзка с това обработката на всички хайверни зърна с метиленово синьо през първите 5 дни на изпитването е от решаващо значение. Изходен разтвор на метиленово синьо се приготвя при 1 mg/ml и се добавя към аквариумите за експозиция, за достигане на максимална крайна концентрация от 2,125 mg/l. Важна забележка: Бодливките не следва да бъдат обработвани с метиленово синьо след излюпването, така че системата следва да не съдържа метиленово синьо в ден 6.
3. Хайверните зърна се проверяват ежедневно и всички мъртви или неоплодени хайверни зърна се записват като такива. Важна забележка: Хайверните зърна не трябва никога да бъдат извън водата до излюпването си, дори да се отнася за много кратки периоди.

▼ M6B.42. **БИОРАЗГРАДИМОСТ В МОРСКА ВОДА**

ОБЩО ВЪВЕДЕНИЕ

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСР (TG) 306 (1992). Когато са разработвани първоначалните методи за изпитване, не е било известно до каква степен резултатите от скрининговите изпитвания за пълна биоразградимост с помощта на сладки води и отпадъчни води или активирана утайка като инокулум биха могли да се прилагат за морската среда. По тази точка са били протоколирани променливи резултати (напр. (1)).
2. Много промишлени отпадъчни води, съдържащи различни химикали, достигат морето или чрез директно изхвърляне, или чрез устията на реките и реките, в които времената на престой са малки в сравнение с периода от време, необходим за пълно биоразграждане на много от съдържащите се химикали. Поради нарастващото осъзнаване на необходимостта от защита на морската среда от увеличаващо се изхвърляне на химикали и необходимостта да се направи оценка на вероятната концентрация на химикали в морето са разработени методи за изпитване за биоразграждане в морска вода.
3. Описаните тук методи използват естествената морска вода както като водна фаза и като източник на микроорганизми. В стремежа си да съответстват на методите за установяване на пълна биоразградимост в сладки води са били проучени използването на ултрафилтрувана морска вода, както и използването на морски седименти като инокулум. Тези проучвания са били неуспешни. Поради това средата за изпитване е морска вода, предварително обработена с цел отстраняване на грубите частици.
4. За оценяване на крайната биоразградимост по метода „разклащане в стъкленница“ трябва да бъдат използвани относително високи концентрации на изпитваното вещество, поради слабата чувствителност на метода за анализ на разтворения органичен въглерод (DOC). Това на свой ред налага добавяне към морската вода на неорганични хранителни вещества (N и P), ниските концентрации на които в противен случай биха ограничили отстраняването на DOC. Освен това в метода на изолираните проби е необходимо да се добавят хранителни съставки поради концентрацията на добавеното изпитвано вещество.
5. Следователно методите не са изпитвания за пълна биоразградимост, тъй като не се прибавя инокулум в допълнение към микроорганизмите, които вече присъстват в морската вода. Също така, при изпитванията не се симулира морската среда, тъй като се добавят хранителни съставки и концентрацията на изпитваното вещество е много по-голяма от евентуалната концентрация в морето. Поради тези причини методите са предложени в нов подраздел „Биоразградимост в морска вода“.

ПРИЛАГАНЕ

6. Резултатите от изпитванията, които следва да се приложат поради това, че начинът на използване и извеждане от употреба на въпросното вещество е посочил насочване към морето, оставят първоначално впечатление за биоразграждане в морска вода. Ако резултатът е положителен (> 70 % отстраняване на POB; > 60 % ThOD — теоретична потребност от кислород), може да се заключи, че е налице потенциал за биоразграждане в морска среда. Въпреки това, евентуален отрицателен резултат не изключва такъв потенциал, но показва, че е необходимо допълнително проучване, например, като се използва максимално ниска концентрация на изпитваното вещество.

▼ **M6**

7. Във всеки случай, ако се изисква по-определена стойност за скоростта или степента на биоразграждане в морска вода в съответния обект, би трябвало да се прилагат други по-комплексни и по-сложни, и следователно, по-скъпи методи. Например, изпитването за симулиране може да се прилага, като се използва концентрацията на изпитваното вещество, разположена по-близо до вероятната концентрация в околната среда. Също така, възможно е да се използва вода, взета от представляващото интерес място, която не е подсилена, нито предварително обработена, а може също първичното биоразграждане да бъде последвано от специфичен химичен анализ. За крайната биоразградимост биха били необходими белязани с ^{14}C вещества, за да могат да бъдат измерени скоростите на отстраняване на разтворимия органичен ^{14}C и на образуване на $^{14}\text{CO}_2$ в концентрации, близки до условията на околната среда.

ИЗБОР НА МЕТОДИ

8. Изборът на метода за използване зависи от редица фактори; Следната таблица е дадена в помощ на избора. Веществата с разтворимост във вода под еквивалента на около 5 mg C/l не могат да се изпитват по метода на разклащането в стъкленница, но, поне по принцип, малко разтворимите вещества могат да се изпитват по метода на изолираните проби.

Таблица

Предимства и недостатъци на изпитванията с разклащане в стъкленница и с изолирани проби

МЕТОД	ПРЕДИМСТВА	НЕДОСТАТЪЦИ
РАЗКЛАЩАНЕ В СТЬКЛЕНИЦА	<ul style="list-style-type: none"> — просто устроен апарат с изключение на анализатора на C — продължителност от 60 дни не е проблем — няма пречения от нитрификация — може да бъде адаптиран за летливи вещества 	<ul style="list-style-type: none"> — необходим е анализатор на C — използва 5-40 mg DOC/l, може да има потискащо въздействие — определянето на DOC е трудно при ниски концентрации в морската вода (ефект на хлоридите) — понякога DOC е висок в морска вода
МЕТОД НА ИЗОЛИРАНИТЕ ПРОБИ	<ul style="list-style-type: none"> — просто устроен апарат — просто крайно определяне — използва ниска концентрация от изпитваното вещество (2 mg/l), като по този начин намалява вероятността от инхибиране — лесно се адаптира за летливи вещества 	<ul style="list-style-type: none"> — може да е трудно да се поддържа херметичността на бутилките — развитието на бактерии по стените може да доведе до неверни стойности — усвояването на O_2 в празните проби може да е високо, особено след 28 дни; — може да се преодолее с оставянето на морската вода да престои — възможно пречене от усвояването на O_2 в резултат от нитрификацията

МЕТОД „РАЗКЛАЩАНЕ В СТЬКЛЕНИЦА“

УВОД

1. Настоящият метод е вариант за морска вода на Модифицирания скрининг на ОИСР, описан в глава В.4-Б от настоящото приложение (2). Той е финализиран в резултат на кръгови изпитвания, организирани за Европейската комисия (ЕК) от Датския институт по качество на водите (3).
2. Също като другия метод за морска вода (метод на изолираните проби), резултатите от това изпитване не следва да се считат като показатели за пълна биоразградимост, но следва да се използват по-специално за получаване на информация относно биоразградимостта на вещества в морската среда.

▼ M6**ПРИНЦИП НА МЕТОДА**

3. Предварително определено количество от изпитваното вещество се разтваря в средата за изпитване до концентрация 5-40 mg разтворен органичен въглерод (DOC)/l. Ако границите на чувствителност на анализите на органичния въглерод са подобрени, използването на по-ниски концентрации от изпитваното вещество може да е полезно, особено за вещества с потискащо действие. Разтворът на изпитваното вещество в изпитвателната среда се инкубира с разбъркване на тъмно или на разсеяна светлина при аеробни условия и определена температура (регулирана до ± 2 °C), която обикновено е в диапазона 15-20 °C. В случаите, когато целта на проучването е симулиране на екологични ситуации, изпитванията могат да се провеждат извън този нормален температурен диапазон. Препоръчителната максимална продължителност на изпитването е около 60 дни. Разграждането се следи чрез измервания на DOC (крайно разграждане) и, в някои случаи, чрез специфичен анализ (първично разграждане).

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

4. За да се разбере дали изпитването може да се приложи към определено вещество, част от свойствата му трябва да са известни. Съдържанието на органичен въглерод във веществото трябва да бъде установен, неговата летливост трябва да бъде такава, че да не възникват значими загуби по време на процеса на изпитване и разтворимостта му във вода следва да бъде по-голяма от еквивалента на 25-40 mg C/l. Също така, не трябва да има значима адсорбция на изпитваното вещество върху стъклени повърхности. За тълкуването на получените резултати следва да има информация за чистотата или относителните дялове на основните компоненти на изпитваното вещество, особено когато резултатът е близък до „праговото“ ниво.
5. Информацията за токсичността на изпитваното вещество спрямо бактерии, както например е измерена в краткосрочни изпитвания на скоростта на дишане (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. Въпреки това, такава информация не винаги е достатъчна за тълкуването на резултатите, получени при изпитването за биоразграждане, и процедурата, описана в точка 18, е по-подходяща.

РЕФЕРЕНТНИ ВЕЩЕСТВА

6. За проверка на микробната активност на пробата от морска вода трябва да се използват подходящи референтни вещества. Примери за вещества, които могат да бъдат използвани за тази цел, са натриевият бензоат, натриевият ацетат и анилинът. Референтните вещества трябва да се разграждат в рамките на разумно кратък период от време, в противен случай се препоръчва това изпитване да се повтори, като се използва друга проба от морска вода.
7. В кръговото изпитване на ЕК, при което пробите от морска вода са взети на различни места и в различно време от годината (3), латентната фаза (t_L) и времето за достигане на 50 процента разграждане (t_{50}) за натриев бензоат, с изключение на латентната фаза, са съответно 1 до 4 дни и 1 до 7 дни. За анилина t_L е варирано от 0 до 10 дни, като в същото време t_{50} е варирано от 1 до 10 дни.

ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ И ЧУВСТВИТЕЛНОСТ НА МЕТОДА

8. Възпроизводимостта на метода е установена в кръговото изпитване (3). Най-ниската концентрация на изпитваното вещество, за която този метод може да бъде използван с анализ на DOC, до голяма степен се определя от границата на откриване при анализа на органичен въглерод (понастоящем около 0,5 mg C/l) и от концентрацията на разтворения органичен въглерод в използваната морска вода (обикновено от порядъка на 3-5 mg/l за вода от открито море). Фоновата концентрация

▼ M6

на DOC не трябва да е надвишава приблизително 20 % от общата концентрация на DOC след добавянето на изпитваното вещество. Ако това не е осъществимо, фоновата концентрация на DOC понякога може да бъде намалена с оставянето на морската вода да престои преди изпитването. Ако методът се използва само със специфичен химичен анализ (чрез който се измерва първичното разграждане), изследователят трябва да документира, като предостави допълнителна информация, дали може да се очаква крайна биоразградимост. Тази допълнителна информация може да се състои от резултатите от други изпитвания за пълна или присъща биоразградимост.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**Апаратура**

9. Стандартна лабораторна апаратура, както и:
 - a. Клатачна машина за разполагане на ерленмайерови колби от 0,5-2 l или с автоматично регулиране на температурата, или използвана в пространство с постоянна температура 15-20 °C контролирана до ± 2 °C;
 - б. Ерленмайерови колби от 0,5-2 l с тясно гърло;
 - в. Апарат за мембранно филтруване или центрофуга;
 - г. Мембранни филтри, 0,2-0,45µm;
 - д. Анализатор на въглерод;
 - е. Оборудване за специфичен анализ (по избор).

Морска вода

10. Взема се проба от морска вода в добре почистен контейнер и се транспортира до лабораторията, за предпочитане в рамките на един или два дни от вземането. По време на транспортирането не се позволява температурата на пробата да надвишава значително температурата, която ще се използва в изпитването. Мястото на пробовземането се определя точно и се описва статусът му по отношение на замърсяванията и хранителните съставки. Особено по отношение на крайбрежните води в тази характеристика следва да се включат брой хетеротрофни микробни колонии и определяне на концентрациите на разтворени нитрати, амониеви йони и фосфати.
11. Посочва се следната информация за самата проба морска вода:
 - дата на вземане;
 - дълбочина на вземане на пробата;
 - външен вид на пробата — мътност, и т.н.;
 - температура по време на вземането;
 - соленост;
 - DOC;
 - период между вземането на пробата и използването ѝ за изпитване.
12. Ако съдържанието на DOC в пробата морска вода е високо (точка 8), препоръчва се морската вода да се остави да престои в продължение на около една седмица преди употреба. Пробата престоива в аеробни условия при температурата на изпитването и на тъмно или при разсеяна светлина. Ако е необходимо аеробните условия се поддържат

▼ M6

с леко аериране. По време на престояването съдържанието на напълно разградима органична материя намалява. При кръговото изпитване (3) не е установена разлика между потенциала за разграждане на престоялата и прясно взетата проба морска вода. Преди употреба морската вода се обработва предварително с цел отстраняване на грубите частици, например чрез филтруване през найлонов филтър или груба филтърна хартия (не мембрана или GF-C филтри), или пък чрез утаяване и декантиране. Процедурата трябва да бъде протоколирана. Ако се прилага предварителна обработка, тя трябва да се извърши след престояването.

Исходни разтвори за неорганични хранителни вещества

13. Приготвят се следните исходни разтвори, като се използват реактиви с квалификация „чист“:

а)	калиев дихидрогенортофосфат, KH_2PO_4	8,50 g
	дикалиев хидрогенортофосфат, K_2HPO_4	21,75 g
	динатриев хидрогенортофосфат дихидрат $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,30 g
	амониев хлорид (NH_4Cl)	0,50 g

Разтваря се в дестилирана вода и се долива до 1 литър.

б)	Калциев хлорид (CaCl_2).	27,50 g
----	-------------------------------------	---------

Разтваря се в дестилирана вода и се долива до 1 литър.

в)	Магнезиев сулфат хептахидрат, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,50 g
----	---	---------

Разтваря се в дестилирана вода и се долива до 1 литър.

г)	железен(III) хлорид хексахидрат, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
----	--	--------

Разтваря се в дестилирана вода и се долива до 1 литър.

Утаяването в разтвор г) може да бъде предотвратено чрез добавяне на една капка концентрирана HCl или 0,4 g динатриева сол на етилендиаминтетраоцетна киселина (EDTA) на литър. Ако се образува утайка в изходния разтвор, той се заменя с прясно приготвен разтвор.

Приготвяне на средата за изпитване

14. Добавя се 1 ml от всеки от тези исходни разтвори на литър от предварително обработена морска вода.

Инокулум

15. Не се добавя специфичен инокулум в допълнение към микроорганизмите, които вече присъстват в морска вода. Определя се (по избор) броят образувачи колонии хетеротрофи в средата от морска вода за изпитване (и за предпочитане също и в първоначалните проби морска вода), например чрез броене върху плаки, с използване на морски агар. Това е особено желателно за проби от крайбрежни или замърсени обекти. Проверява се хетеротрофната микробна активност в морска вода чрез провеждане на изпитване с референтно вещество.

▼ **M6****Приготвяне на стъклениците**

16. Гарантира се, че всички изделия от стъкло са безупречно чисти, без да е необходимо да са стерилни, (например чрез използване на алкохолен разтвор на хлороводород), промити и подсушени преди употреба, за да се избегне замърсяването им с остатъци от предишни изпитвания. Стъклениците трябва също така да бъдат почистени преди първото използване.
17. Оценката на изпитваните вещества се извършва в две стъкленици с повторения едновременно, заедно с една стъкленица за референтното вещество. За аналитично определяне на празни проби се извършва изпитване на празна проба, в две повторения, като в нея не се съдържа нито изпитваното, нито референтното вещество. Изпитваните вещества се разтварят в средата за изпитване — те могат да бъдат добавени по подходящ начин чрез концентриран изходен разтвор — за постигане на желаните начални концентрации, обикновено от 5-40 mg DOC/l. Референтното вещество обикновено се изпитва при начални концентрации, съответстващи на 20 mg DOC/l. Ако се използват изходни разтвори на изпитвано и/или референтно вещества, се гарантира, че солеността на средата от морска вода не е значително променена.
18. Ако могат да се очакват или не могат да бъдат изключени токсични въздействия, може да е препоръчително в планирането на изпитването да се включи опит за потискане, в две повторения. Изпитваното и референтното вещества се добавят в същия съд, като концентрацията на референтното вещество обикновено е същата, както при изпитването на контролата (т.е., 20 mg DOC/l), за да се даде възможност за сравнение.
19. В ерленмайеровите колби се поставят достатъчни количества от изпитваните разтвори (подходящо количество е до около половината от обема на колбите), и впоследствие всяка колба се снабдява с нехерметично покритие (например алуминиево фолио), което дава възможност за газообмен между колбата и околния въздух. (памучните тапи са неподходящи, ако се използва анализ на DOC). Съдовете се поставят на клатачната машина и се разклащат непрекъснато и леко (напр. при 100 rpm) през цялото време на изпитването. Температурата се контролира (15-20 °C и в рамките на ± 2 °C) и съдовете се защитават срещу попадане на светлина, за да се избегне растеж на водорасли. Гарантира се, че въздухът не съдържа токсични материали.

Контролно изпитване за физични и химични свойства

20. Ако се подозират механизми на абиотично разграждане, като например хидролиза (проблематична само при специфичен анализ), изпарение или адсорбция, се препоръчва да се извърши контролно изпитване за физични и химични свойства. Това може да бъде постигнато чрез добавяне на живачен(II) хлорид (HgCl_2)⁽¹⁾ (50-100 mg/l) в съдове с изпитваното вещество с цел спиране на микробната активност. Значимо намаляване на DOC или на концентрацията на друго специфично вещество в контролното изпитване за физични/химични свойства показва механизми на абиотично отстраняване. (ако се използва живачен хлорид, следва да бъде обърнато внимание на пречения или на каталитично отравяне при анализа на DOC.)

Брой на колбите

21. В едно типично провеждане се използват следните колби:
 - Колби 1 и 2 — съдържат изпитваното вещество (изпитваната суспензия).
 - Колби 3 и 4 — съдържат само морска вода (празна проба);
 - Колба 5 — съдържа сравнително вещество (контрола за процедурата).
 - Колба 6 — съдържа изпитвано и референтно вещества (контрола за токсичност) — по избор;
 - Колба 7 — съдържа изпитвано вещество и средство за стерилизиране (абиотична стерилна контрола) — по избор.

⁽¹⁾ Живачният(II) хлорид (HgCl_2) е силно токсично вещество, с което следва да се борави с подходящи предпазни мерки. Отпадъците във водна среда, съдържащи това вещество, трябва да се обезвреждат по подходящ начин; те не трябва да бъдат изхвърляни в системата на отпадъчните води.

▼ **M6****Анализ на DOC**

22. В хода на изпитването през подходящи интервали от време се вземат проби за анализ на DOC (допълнение 1). Пробовземането винаги е при започване на изпитването (ден 0) и на ден 60. За описание на разграждането във времето общо се изискват най-малко пет проби. Не може да се посочи фиксиран времеви график за вземане на проби, тъй като скоростта на биоразграждането варира. Извършва се определяне на DOC в две повторения за всяка проба.

Пробовземане

23. Изискваният обем на пробите зависи от метода за анализ (специфичен анализ), от използвания апарат за анализ на въглерод, и от процедурата (мембранно филтруване или центрофугиране), избрана за обработка на пробите преди определянето на въглерода (точки 25 и 26). Преди вземането на проби се гарантира, че средата за изпитването е добре размесена и че всички материали, полепнали по стените на колбата, са разтворени или суспендирани.
24. Веднага след пробовземането се извършва мембранно филтруване или центрофугиране. Ако е необходимо, филтруваните или центрофугираните проби се съхраняват при 2-4 °C за максимум 48 часа, или под - 18 °C за по-дълги периоди (ако е известно, че веществото ще остане незасегнато, преди съхранението се извършва ацидификация до pH 2).
25. Мембранните филтри (0,2-0,45 µm), като например поликарбонатни мембранни филтри, са подходящи, ако е гарантирано, че нито освобождават въглерод, нито адсорбират веществото по време на филтруването. Някои мембранни филтри са импрегнирани с повърхностно-активни вещества за хидрофилизация и могат да отделят значителни количества разтворен въглерод. Такива филтри се подготвят чрез изваряване в дейонизирана вода три пъти последователно, всеки път по един час. След изваряването филтрите се съхраняват в дейонизирана вода. Отстраняват се началните 20 ml от филтратата.
26. Като алтернатива на мембранно филтруване може да бъде избрано центрофугиране на пробите. Центрофугирането се извършва при $40\,000\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ (~ 4 000 g) в продължение на 15 минути, за предпочитане в центрофуга с охлаждане.

Забележка: Както изглежда, разграничаването на общия органичен въглерод (TOC) и DOC (TOC/DOC) при центрофугиране не функционира при много ниски концентрации, тъй като или не са отстранени всички бактерии, или въглеродът като част от бактериалната плазма се е разтворил повторно. При по-високи концентрации на изпитване (> 10 mg C/l) грешката при центрофугирането изглежда сравнително малка.

Честота на вземане на пробите

27. Ако анализите се извършват веднага след вземане на проби, оценката на следващото време за пробовземане се прави, като се вземе предвид резултатът от аналитичното определяне.
28. Ако пробите се съхраняват (точка 24) за анализ на по-късен етап, взема се по-голям от изисквания минимален брой от пет проби. Последните проби се анализират най-напред, и чрез избор „сър стъпка назад“ на подходящите проби за анализ е възможно да се получи добро описание на кривата на биоразграждане с относително малък брой аналитични определяния. Ако до края на изпитването не е протекло разграждане, не е необходимо да бъдат анализирани допълнителни проби, и при това положение стратегията „сър стъпка назад“ може да спести значителни разходи за анализ.

▼ **M6**

29. Ако се наблюдава плато на кривата на разграждане преди 60-ия ден, изпитването се прекратява. Ако протичането на разграждане очевидно е започнало към ден 60, но още не е достигнато плато, опитът се удължава за по-нататъшен период.

ДАНИИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Обработка на резултатите**

30. Резултатите от анализа се записват върху приложените таблици с данни (допълнение 2) и стойностите на биоразграждането както за изпитваното, така и за референтното вещество, се изчисляват от уравнението:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

където:

- D_t = разграждане в процент DOC или отстраняване на специфично вещество в момент t ,
- C_0 = начална концентрация на DOC или на специфично вещество в средата за изпитване,
- C_t = концентрация на DOC или на специфично вещество в средата за изпитване в момент t ,
- $C_{bl(0)}$ = начална концентрация на DOC или на специфично вещество в празната проба,
- $C_{bl(t)}$ = концентрация на DOC или на специфично вещество в празната проба в момент t ,
31. Разграждането се посочва като процентно отстраняване на DOC (крайно разграждане) или отстраняване на специфично вещество (първично разграждане) в момент t . Концентрациите на DOC се изчисляват с точност до 0,1 mg на литър, а средните стойности на D_t се закръглят до най-близкия цял процент.
32. Процесът на разграждане се илюстрира в графичен вид на диаграма, както е показано на фигурата във „Валидност и интерпретиране на резултатите“. Ако са налице достатъчно данни, от кривата се изчисляват латентната фаза (t_L) и времето за достигане на 50 процента отстраняване от края на латентната фаза (t_{50}).

Протокол от изпитването

33. Протоколът от изпитването трябва да включва следната информация:

Изпитвано вещество:

- физична природа и, където е относимо, физични и химични свойства;
- данни за идентичността.

Условия на изпитването:

- местоположение и описание на мястото на пробовземане; статусът му по отношение на замърсяванията и хранителните съставки (брой на колонии, нитрати, амониеви йони, фосфати, ако е приложимо);
- характеристики на пробата (дата на пробовземане, дълбочина, външен вид, температура, соленост, DOC (по избор), период между вземането на пробата и използването ѝ за изпитването);

▼ **M6**

- използван метод за оставяне за престояване на морска вода (ако има такъв);
- използван метод за предварителна обработка (филтруване/утаяване) на морската вода;
- метод, използван за определяне на DOC;
- метод, използван за специфичен анализ (по избор).
- метод, използван за определянето на броя на хетеротрофите в морската вода (метод чрез броене върху плаки или алтернативна процедура) (по избор);
- други методи (по избор), използвани за характеризирание на морската вода (измервания на АТФ и др.).

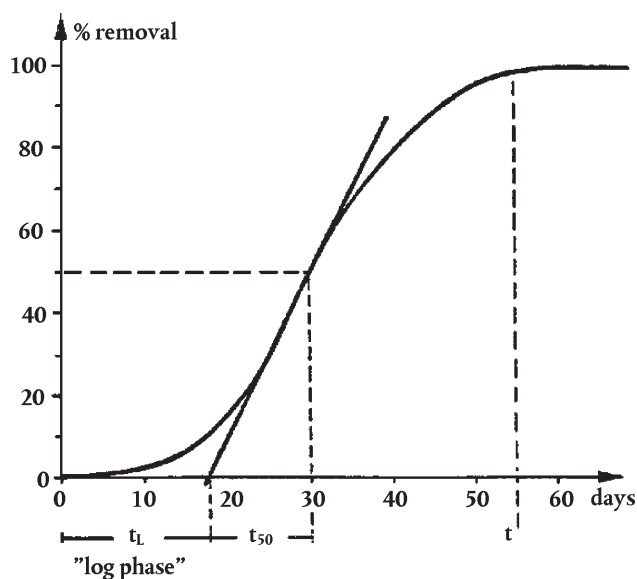
Резултати:

- аналитичните данни се протоколират в таблица с данни (допълнение 2);
- Протичането на изпитването за разграждане се представя графично на диаграма, показваща латентната фаза (t_L), наклонът и времето (от края на латентната фаза) за достигане на 50 процента отстраняване (t_{50}). Латентната фаза може да се оцени графично, както е показано на фигурата в раздел „Валидност и интерпретиране на резултатите“, или за удобство може да бъде взета като времето, необходимо за 10 процента разграждане;
- процент на разграждане, измерен след 60 дни, или в края на изпитването.

*Обсъждане на резултатите.***Валидност и интерпретиране на резултатите**

34. Резултатите, получени с референтни вещества, например натриев бензоат, натриев ацетат или анилин, следва да бъдат сравними с резултатите, получени при кръговото изпитване (3) (виж раздел „Референтни вещества“, точка 7). Ако резултатите, получени с референтни вещества, са нетипични, изпитването трябва да се повтори, като се използва друга проба морска вода. Въпреки че резултатите от изпитванията за потискане не винаги са лесни за интерпретиране поради приноса на DOC от изпитваното вещество, значително намаляване на общия процент на отстраняване на DOC в сравнение с този на контролата е положителен знак за токсични въздействия.
35. Поради използваните относително високи концентрации на изпитване в сравнение с повечето природни системи (и оттам — неблагоприятното съотношение между концентрациите на изпитваните вещества и други източници на въглерод) методът следва да се разглежда като предварителен тест, който може да се използва, за да се посочи дали веществото е напълно биоразградимо. Съответно ниският резултат не винаги означава, че изпитваното вещество не е биоразградимо в морска среда, но показва, че е необходима повече работа, за да може да се установи това.

На фигурата по-долу е даден примерен опит за теоретично разграждане, илюстриращ осъществим начин на оценка на стойностите на t_L (продължителност на „латентната фаза“) и t_{50} (времеви интервал, започващ от t_L), необходими за достигане на 50 процента отстраняване.

▼ M6**МЕТОД НА ИЗОЛИРАНИТЕ ПРОБИ**

УВОД

1. Този метод е вариант с морска вода на изпитването с изолирани проби (5) и е финализиран в резултат на кръгово изпитване, организирано за Европейската комисия (ЕК) от Датския институт по качество на водите (3).
2. Също като другия метод „разклащане в стъкленница“ за морска вода, резултатите от това изпитване не следва да се считат като показания за пълна биоразградимост, но следва да се използват за специално за получаване на информация относно биоразградимостта на вещества в морска среда.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА

3. Предварително определено количество от изпитваното вещество се разтваря в средата за изпитване, обикновено в концентрация 2-10 mg изпитвано вещество на литър (могат да бъдат използвани една или повече концентрации). Разтворът се съхранява в пълна затворена бутилка на тъмно в термостатирана вана при постоянна температура или в затворено пространство при постоянна температура, регулирана с точност ± 1 °C в интервала от 15-20 °C. В случаите, когато целта на проучването е симулиране на екологични ситуации, изпитванията могат да се провеждат извън този нормален температурен диапазон, ако са направени подходящи корекции за регулиране на температурата. Разграждането се следи чрез анализ на кислорода в течение на 28-дневен период.
4. Кръговото изпитване е показало, че ако изпитването се удължава след 28 дни, в повечето случаи не може да бъде събрана полезна информация, поради сериозни пречения. Стойностите на биологичната потребност от кислород (БПК) в празната проба са били прекомерно високи, което вероятно се дължи на развитието по стените, причинено от липса на разбъркване, и на нитрификацията. Следователно препоръчителната продължителност е 28 дни, но ако стойностите на БПК в празната проба остават в рамките на 30-процентната граница (точки 15 и 40), изпитването може да се удължи.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

5. За да се разбере дали изпитването може да се приложи към определено вещество, част от свойствата му трябва да са известни. Изисква се емпиричната формула, за да може да бъде изчислена теоретичната потребност от кислород (ТПК) (вж. допълнение 3); в противен случай трябва да бъде определена химичната потребност от кислород (ХПК) на веществото, която да служи като референтна стойност. Използването на ХПК е по-малко задоволително, тъй като някои вещества не се окисляват напълно при изпитване за ХПК.

▼ M6

6. Разтворимостта на веществото трябва да бъде поне 2 mg/l, макар че по принцип могат да бъдат изпитвани по-малко разтворими вещества (напр. чрез разбъркване с ултразвук), както и летливи вещества. За тълкуването на получените резултати следва да има информация за чистотата или относителните дялове на основните компоненти на изпитваното вещество, особено когато резултатът е близък до „праговото“ ниво.
7. Информацията за токсичността на веществото спрямо бактерии, както например е измерена в краткосрочни изпитвания на дишането (4) може да бъде много полезна при избирането на подходящи концентрации за изпитване и може да бъде особено важна за правилното тълкуване при ниски стойности на биоразграждането. Въпреки това, такава информация не винаги е достатъчна за тълкуването на резултатите, получени при изпитването за биоразграждане, и процедурата, описана в точка 27, е по-подходяща.

РЕФЕРЕНТНИ ВЕЩЕСТВА

8. За проверка на микробната активност на пробата от морска вода трябва да се използват подходящи референтни вещества. За тази цел могат да бъдат използвани (например) анилин, натриев ацетат или натриев бензоат. Разграждане на тези вещества от най-малко 60 процента (от тяхната ТПК) трябва да се получава в рамките на разумно кратък период от време, в противен случай се препоръчва изпитването да се повтори, като се използва друга проба от морска вода.
9. В кръговото изпитване на ЕК, при което пробите от морска вода са взети на различни места и в различно време от годината, латентната фаза (t_L) и времето за достигане на 50 процента разграждане (t_{50}) за натриев бензоат, с изключение на латентната фаза, са съответно 0 до 2 дни и 1 до 4 дни. По отношение на анилина стойностите на t_L и t_{50} са били съответно от 0 до 7 и от 2 до 12 дни.

ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ

10. Възпроизводимостта на методите е установена в кръговото изпитване (3).

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**Апаратура**

11. Стандартно лабораторно оборудване и:
 - а) могат да се използват бутилки за БПК с вместимост 250-300 ml със стъклени запушалки или бутилки с вместимост 250-300 ml с тясно гърло и стъклени запушалки;
 - б) няколко 2-, 3- и 4-литрови бутилки с отметки за литрите за подготовката на опита и за пълненето на бутилките за БПК;
 - в) Водна баня или пространство с постоянна температура за съхранение на бутилките при постоянна температура (± 1 °C), защитени от светлина.
 - г) Оборудване за анализ на разтворения кислород;
 - д) Мембранни филтри, 0,2-0,45 μ m (по избор);
 - е) Оборудване за специфичен анализ (по избор).

Морска вода

12. Взема се проба от морска вода в добре почистен контейнер и се транспортира до лабораторията, за предпочитане в рамките на един или два дни от вземането. По време на транспортирането не се позволява температурата на пробата да надвишава значително температурата, която ще се използва в изпитването.

▼ **M6**

13. Мястото на пробовземането се определя точно и се описва статусът му по отношение на замърсяванията и хранителните съставки. Особено по отношение на крайбрежните и замърсените води в тази характеристика следва да се включат брой хетеротрофни микробни колонии и определяне на концентрациите на разтворени нитрати, амониеви йони и фосфати.
14. Посочва се следната информация за самата проба морска вода:
- дата на вземане;
 - дълбочина на вземане на пробата;
 - външен вид на пробата — мътност, и т.н.;
 - температура по време на вземането;
 - соленост;
 - разтворен органичен въглерод (DOC):
 - период между вземането на пробата и използването ѝ за изпитване.
15. Ако съдържанието на DOC в пробата морска вода е високо (точка 8), препоръчва се морската вода да се остави да престои в продължение на около една седмица преди употреба.
16. Престоиването на пробата е чрез съхраняване в аеробни условия при температурата на изпитването и на тъмно или при разсеяна светлина. Ако е необходимо, се поддържат аеробни условия с леко аериране. По време на престоиването съдържанието на напълно разградима органична материя намалява. При кръговото изпитване (3) не е установена разлика между потенциала за разграждане на престоилата и пряно взетата проба морска вода.
17. Преди употреба морската вода се обработва предварително с цел отстраняване на грубите частици, например чрез филтруване през найлонов филтър или груба филтърна хартия (не мембрана или GF-C филтри), или пък чрез утаяване и декантиране. Използваната процедура се протоколира. Ако се прилага предварителна обработка, тя трябва да се извърши след престоиването.

Исходни разтвори за неорганични хранителни вещества

18. Приготвят се следните исходни разтвори, като се използват реактиви с квалификация „чист“:
- | | | |
|----|---|---------|
| a) | калиев дихидрогенортофосфат, KH_2PO_4 | 8,50 g |
| | дикалиев хидрогенортофосфат, K_2HPO_4 | 21,75 g |
| | динатриев хидрогенортофосфат дихидрат $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 33,30 g |
| | амониев хлорид (NH_4Cl) | 0,50 g |
| | Разтваря се в дестилирана вода и се долива до 1 литър. | |
| b) | Калциев хлорид (CaCl_2). | 27,50 g |
| | Разтваря се в дестилирана вода и се долива до 1 литър. | |
| v) | Магнезиев сулфат хептахидрат, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 22,50 g |
| | Разтваря се в дестилирана вода и се долива до 1 литър. | |
| г) | железен(III) хлорид хексахидрат, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,25 g |
| | Разтваря се в дестилирана вода и се долива до 1 литър. | |

▼ M6

Утаяването в разтвор г) може да бъде предотвратено чрез добавяне на една капка концентрирана HCl или 0,4 g динариева сол на етилендиаминтетраоцетна киселина (EDTA) на литър. Ако се образува утайка в изходния разтвор, той се заменя с прясно приготвен разтвор.

Приготвяне на средата за изпитване

19. На един литър предварително обработена морска вода се добавя 1 ml от всеки от горепосочените изходни разтвори. Изпитваната среда се насища с въздух при температурата на изпитването, чрез аериране с чист сгъстен въздух за около 20 минути. Определя се концентрацията на разтворения кислород с контролна цел. Концентрацията на разтворения кислород при насищане, като функция на солеността и температурата, могат да бъдат прочетени от номограмата, приложена към настоящия метод за изпитване (допълнение 4).

Инокулум

20. Не се добавя специфичен инокулум в допълнение към микроорганизмите, които вече присъстват в морска вода. Определя се (по избор) броят образуващи колонии хетеротрофи в средата от морска вода за изпитване (и за предпочитане също и в първоначалната проба морска вода), например чрез броене върху плаки, с използване на морски агар. Това е особено желателно за проби от крайбрежни или замърсени обекти. Проверява се хетеротрофната микробна активност в морска вода чрез провеждане на изпитване с референтно вещество.

Приготвяне на бутилките за изпитване

21. Изпълняват се всички необходими манипулации, включително престояването и предварителната обработка на морската вода при избраната температура на изпитване от 15 до 20 °C, като се гарантира чистота, но не стерилност, на всички изделия от стъкло.
22. Приготвят се групи от бутилки за БПК за определяне на БПК на изпитваното и референтното вещество в едновременни серии от опити. Извършват се всички анализи на двукратните повторения (празни проби, референтно и изпитвано вещества), т.е. приготвят се по две бутилки за всяко определяне. Извършват се анализи най-малко през дни 0, 5, 15 и 28 (четири определяния). Четири определяния за анализите на кислорода изискват общо $3 \times 2 \times 4 = 24$ бутилки (празна проба, референтно и изпитвано вещества) и, следователно, около 8 литра от средата за изпитване (за една концентрация от изпитваното вещество).
23. Разтвори на референтното и изпитваното вещества се приготвят отделно в големи бутилки с достатъчен обем (точка 11), като първо се добавят референтното и изпитваното вещества или пряко, или, чрез използване на концентриран изходен разтвор, към частично напълнените големи бутилки. Добавя се допълнително среда за изпитване, за получаване на желаните крайни концентрации. Ако се използват изходни разтвори на изпитвани и/или референтни вещества, се гарантира, че солеността на средата от морска вода не е значително променена.
24. Концентрациите на референтното и изпитваното вещества се избират, като се вземат предвид:
 - а) разтворимостта на разтворения кислород в морска вода при преобладаващата температура на изпитването и соленост (вж. приложената номограма — допълнение 4);
 - б) БПК на празната проба морска вода; както и
 - в) очакваната биоразградимост на изпитваното вещество.

▼ **M6**

25. При 15 °C и 20 °C и 32 промила соленост (океанска вода), разтворимостта на разтворения кислород е съответно около 8,1 и 7,4 mg/l. Потреблението на кислород на самата морска вода (дишане в празната проба) може да бъде 2 mg O₂/l или повече, ако морската вода не е оставена да престои. Поради това, с цел да се гарантира значима концентрация на кислород, оставаща след окисляване на изпитваното вещество, се използва начална концентрация на изпитваното вещество от около 2-3 mg/l (в зависимост от ТПК) за веществата, при които се очаква пълно разграждане при условията на изпитването (като например референтните вещества). По-малко разградимите вещества се изпитват при по-високи концентрации, до около 10 mg/l, ако не се получават токсични въздействия. Може да бъде полезно да се проведат успоредни изпитвания с ниска (около 2 mg/l) и висока (около 10 mg/l) концентрация на изпитваното вещество.
26. Трябва успоредно да се определят стойностите на кислорода в празната проба в бутилките, които не съдържат нито изпитваното, нито референтното вещество.
27. Ако трябва да се определят въздействия за потискане, се приготвят следните серии от разтвори в отделни големи бутилки (точка 13):
- а) 2 mg напълно разградимо вещество на литър, напр. всяко от посочените референтни вещества;
 - б) x mg от изпитваното вещество/l (x обикновено е 2);
 - в) 2 mg напълно разградимо вещество на литър плюс x mg от изпитваното вещество/l.

Контролно изпитване за физични и химични свойства

28. Ако се използва възможността за провеждане на специфични анализи, може да се извърши контролно изпитване за физични и химични свойства с цел да се провери дали изпитваното вещество се отстранява чрез абиотични механизми, като хидролиза или адсорбция. Контролно изпитване за физични и химични свойства може да бъде извършено чрез добавяне на живачен(II) хлорид (HgCl₂)⁽¹⁾ (50-100 mg/l) в колби с двукратни повторения с изпитвано вещество, с цел спиране на микробната активност. Значимо намаляване на концентрацията на специфично вещество в по време на изпитването показва механизми на абиотично отстраняване.

Брой на бутилките за БПК при типично провеждане

29. В типичното провеждане се използват следните бутилки:
- най-малко 8, съдържащи изпитвано вещество;
 - най-малко 8, съдържащи само подсилена с хранителни съставки морска вода;
 - най-малко 8, съдържащи референтно вещество и, ако е необходимо
 - 6 бутилки, съдържащи изпитвано и референтно вещества (контрола за токсичност).

ПРОЦЕДУРА

30. Незабавно след приготвянето, от долната четвърт (не от дъното) на съответната голяма бутилка се източва всеки разтвор, и се запълват съответната група от бутилки за БПК. Незабавно се анализират нулевите контроли (във време нула) за разтворен кислород (точка 33) или същите се съхраняват за последващ химичен анализ чрез утаяване с MnCl₂ (манганов(II) хлорид) и NaOH (натриев хидроксид).

⁽¹⁾ Живачният(II) хлорид (HgCl₂) е силно токсично вещество, с което следва да се борави с подходящи предпазни мерки. Отпадъците във водна среда, съдържащи това вещество, трябва да се обезвреждат по подходящ начин; те не трябва да бъдат изхвърляни пряко в системата на отпадъчните води.

▼ **M6**

31. Оставащите успоредни бутилки за БПК се инкубират при температурата на изпитването (15-20 °C), съхраняват се на тъмно, и се отстраняват от зоната за инкубация през подходящи интервали от време (например след 5, 15 и 28 дни, като минимум) и се извършва анализ за разтворен кислород (точка 33).
32. Пробите за специфични анализи (по избор) се филтрат през мембрана (0,45-0,2 µm) или се центрофугират в продължение на 15 минути. Съхраняват се в продължение на най-много 48 часа при 2-4 °C, или за по-дълъг период при – 18 °C, ако не се анализират незабавно (ако е известно, че веществото ще остане незасегнато, преди съхранението се извършва ацидификация до pH 2).

Определяне на разтворения кислород

33. Определя се концентрацията на разтворения кислород с използване на химически или електрохимически метод, който е признат на национално или международно равнище.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ

Обработка на резултатите

34. Резултатите от анализа се записват върху приложените таблици с данни (допълнение 5)
35. БПК се изчислява като разликата в намаляването на кислорода между празна проба и разтвор на изпитваното вещество при условията на изпитването. Нетното намаляване на кислорода се разделя на концентрацията (w/v) на веществото, за да се изрази БПК като mg БПК/mg изпитвано вещество. Разграждането се определя като отношението на биохимичната потребност от кислород или (за предпочитане) към теоретичната потребност от кислород (ТПК), или към химичната потребност от кислород (ХПК), и се изразява като процент (вж. точка 36).
36. Стойностите на биоразграждането се изчисляват за всяка времева точка на пробовземане както за изпитваното, така и за референтното вещество, с използване на едното или другото от посочените уравнения:

$$\% \text{ biodegradation} = \frac{\text{mg } O_2 / \text{mg tested substance}}{\text{mg ThOD} / \text{mg tested substance}} \times 100$$

$$\% \text{ biodegradation} = \frac{\text{mg } O_2 / \text{mg tested substance}}{\text{mg COD} / \text{mg tested substance}} \times 100$$

където:

ThOD = теоретична потребност от кислород (изчисляване, допълнение 3)

COD = химична потребност от кислород, определена опитно.

Забележка: Понякога двата начина на изчисляване (процент от ТПК или процент от ХПК) не дават еднакви резултати; използването на ТПК е за предпочитане, тъй като някои вещества не се окисляват напълно при изпитване за ХПК.

37. Процесът на изпитването за разграждане се илюстрира в графичен вид на диаграма (вж. пример в раздела „Валидност и интерпретиране на резултатите“). Ако са налице достатъчно данни, от кривата за биоразграждането се изчисляват латентната фаза (t_L) и времето (t_{50}) за достигане на 50 процента отстраняване от края на латентната фаза.
38. Ако се използва специфичен анализ (по избор), се посочва процентът на първично разграждане като процент на отстраняване на специфичното вещество в рамките на периода на изпитването (коригиран със стойността, получена в аналитичните празни проби).

▼ **M6****Протокол от изпитването**

39. Протоколът от изпитването трябва да включва следната информация:

Изпитвано вещество:

- физична природа и, където е относимо, физични и химични свойства;
- данни за идентичността.

Условия на изпитването:

- местоположение и описание на мястото на пробовземане; статусът му по отношение на замърсяванията и хранителните съставки (брой на колониите, нитрати, амониеви йони, фосфати, ако е приложимо);
- характеристики на пробата (дата на пробовземане, дълбочина, външен вид, температура, соленост, DOC (по избор), период между вземането на пробата и използването ѝ за изпитването);
- използван метод за оставяне за престояване на морска вода (ако има такъв);
- използван метод за предварителна обработка (филтруване/утаяване) на морската вода;
- метод, използван за определянето на ХПК (ако е извършено);
- метод, използван за измерването на кислорода;
- процедура за диспергиране на вещества, които са малко разтворими при условията на изпитване;
- метод, използван за определянето на броя на хетеротрофите в морската вода (метод чрез броене върху плаки или алтернативна процедура);
- метод, използван за определяне на DOC в морска вода (по избор);
- метод, използван за специфичен анализ (по избор);
- други методи по избор, използвани за характеризирание на морската вода (измервания на АТФ и др.).

Резултати:

- аналитичните данни се протоколират в таблица с данни (приложена, допълнение 5);
- протичането на изпитването за разграждане се представя графично на диаграма, показваща латентната фаза (t_L), наклонът и времето (от края на латентната фаза) за достигане на 50 процента от крайното усвояване на кислород, причинено от окисление на изпитваното вещество (t_{50}). Латентната фаза може да се оцени графично, както е показано на приложената фигура, или за удобство може да бъде взета като времето, необходимо за 10 процента разграждане;
- процент на разграждане, измерен след 28 дни.

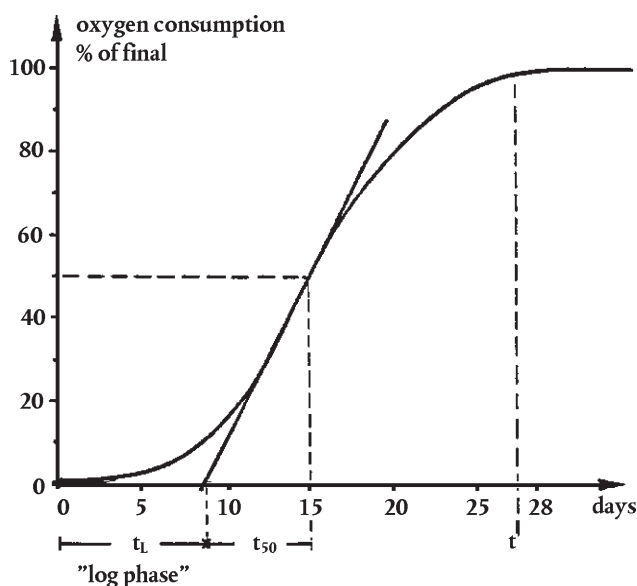
*Обсъждане на резултатите.***Валидност и интерпретиране на резултатите**

40. Дишането в празната проба не трябва да надхвърля 30 процента от кислорода в бутилката за изпитване. Ако не е възможно да се изпълни този критерий с прясно взета морска вода, морската вода трябва да се остави да престои (да се стабилизира) преди употреба.
41. Следва да се вземе под внимание възможността азотсъдържащи вещества да повлияят на резултатите.

▼ M6

42. Резултатите, получени с референтните вещества, натриев бензоат и анилин следва да бъдат сравними с резултатите, получени по време на кръговото изпитване (3) (точка 9). Ако резултатите, получени с референтни вещества, са нетипични, изпитването трябва да се повтори, като се използва друга проба морска вода.
43. Изпитваното вещество може да се счита за потискащо за бактерии (при използваната концентрация) ако БПК на сместа от референтното и изпитваното вещество е по-малка от сбора на БПК на отделните разтвори на двете вещества.
44. Поради относително високите концентрации на изпитване в сравнение с повечето природни системи и оттам — неблагоприятното съотношение между концентрациите на изпитваното вещество и други източници на въглерод, методът следва да се разглежда като предварителен тест, който може да се използва, за да се посочи дали веществото е напълно биоразградимо. Съответно niskият резултат не винаги означава, че изпитваното вещество не е биоразградимо в морска среда, но показва, че е необходима повече работа, за да може да се установи това.

По-долу е даден примерен опит за теоретично разграждане, илюстриращ осъществим начин на оценка на стойностите на t_L (продължителност на „латентната фаза“) и t_{50} , времеви интервал (започващ от t_L), необходим за достигане на 50 процента от крайното усвояване на кислород, причинено от окисление на изпитваното вещество:



ЛИТЕРАТУРА

- (1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. *Chemosphere*, 10 (6); 561-573.
- (2) Глава В.4-Б от настоящото приложение: „Определяне на пряката биологична разградимост“ част III Модифициран скрининг на ОИСП
- (3) Nyholm N. and Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, March 1987, Commission of the European Communities.
- (4) Глава В.11 от настоящото приложение: Биоразграждане — изпитване за потискане дишането на активирана утайка.
- (5) Глава В.4-Д от настоящото приложение: Определяне на пълната биоразградимост, част VI. Изпитване с изолирани проби

▼ **M6***Допълнение 1***Определяне на органичен въглерод в морска вода****МЕТОД „РАЗКЛАЩАНЕ В СТЪКЛЕНИЦА“**

За определяне на съдържанието на органичен въглерод във водна проба, органичните съединения в пробата се окисляват до въглероден диоксид, като за тази цел обикновено се използва една от следните три техники:

- окисляване във воден разтвор с персулфат/ултравиолетови лъчи;
- окисляване във воден разтвор с персулфат/висока температура (116-130 °C);
- изгаряне.

Участващият CO₂ се определя количествено, с използване инфрачервена спектроскопия или титриметрия. Като алтернатива, CO₂ се редуцира до метан, който се определя количествено с пламъчно-йонизационен детектор (FID).

Методът с персулфат/ултравиолетови лъчи обикновено се използва за анализ на „чиста“ вода с ниско съдържание на твърди частици. Последните два метода могат да се прилагат за повечето видове водни проби, като окисляването с персулфат/висока температура е най-подходящо за проби с ниско съдържание, а техниката с изгарянето е приложима за проби със съдържание на нелетлив органичен въглерод много над 1 mg C/l.

Пречения

И трите метода са зависими от отстраняването на съдържащия се в пробата неорганичен въглерод (IC), или от компенсирането му. Прочистване подкислената проба от CO₂ е най-често използваният метод за отстраняване на неорганичен въглерод, въпреки че това също води до загуба на летливи органични съединения (1). Пълното отстраняване или компенсиране на неорганичния въглерод трябва да се гарантира за всяка матрица на пробата, и летливият органичен въглерод трябва да бъде определен в допълнение към нелетливия органичен въглерод в зависимост от вид на пробата.

Високите концентрации на хлориди водят до намалена ефикасност на окисляването при използването на метода с персулфат/ултравиолетови лъчи (2). Прилагане на окисляващ реактив, модифициран чрез добавяне на живачен(III) нитрат може обаче да отстрани това пречене. Препоръчва се за оценка на всеки тип съдържаща хлориди проба да се използва максимално допустимият обем на пробата. Високи концентрации на сол в проба, анализирана с използване на метода на изгарянето, може да причини покриване на катализатора със сол и прекомерна корозия на горивната тръба. Следва да се вземат предпазни мерки в съответствие с ръководството на производителя.

Много мътни проби, както и проби, съдържащи твърди частици, може да не се окислят напълно бъде ненапълно окислени при използването на метода с персулфат/ултравиолетови лъчи.

Пример за подходящ метод

Нелетливият органичен въглерод се определя чрез окисляване с персулфат/ултравиолетови лъчи и последващо количествено определяне на отделения CO₂ с използване на недисперсионна инфрачервена спектроскопия.

Окисляващият реактив се модифицира в съответствие с препоръките, дадени в (2), както е описано в ръководството на производителя:

- а) 8,2 g HgCl₂ и 9,6 g Hg(NO₃)₂ · H₂O се разтварят в няколко стотици милилитра вода с квалификация „чист“ и ниска концентрация на въглерод.
- б) 20 g K₂S₂O₈ се разтварят в разтвора на живачни соли.

▼M6

б) 5 ml HNO₃ (конц.) се добавят към сместа.

г) реактивът се разрежда до 1 000 ml.

Преченията от хлориди се отстраняват с използване на проба с обем 40 µl за 10 процента хлориди и проба с обем 200 µl за 1,9 процента хлориди. Пробите с високи концентрации на хлориди и/или по-големи обеми проби могат да бъдат анализирани в съответствие с този метод, при условие че се предотврати увеличаването на хлоридите в съда за окисление. впоследствие може да бъде извършено определяне на летливия органичен въглерод за въпросния тип проба, ако е относимо.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) ISO, Water quality — determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, January 16, 1986.
- (2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Също така представлява интерес (дава описание на система за автоматизиран анализ):

- (3) Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.

▼ **M6**

Допълнение 2

Биоразграждане в морска вода

МЕТОД „РАЗКЛАЩАНЕ В СТЪКЛЕНИЦА“

ТАБЛИЦА С ДАННИ

1. **ЛАБОРАТОРИЯ:**2. **ДАТА НА ЗАПОЧВАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО:**3. **ИЗПИТВАНО ВЕЩЕСТВО:**

Наименование:

Концентрация на изходния разтвор: mg/l като вещество

Начална концентрация в средата, t_0 : mg/l като вещество

: mg DOC/l

4. **МОРСКА ВОДА:**

Източник:

Дата на вземане:

Дълбочина на вземане на пробата;

Външен вид в момента на вземане (напр. мътна и т.н.):

Соленост при вземането: ‰

Температура при вземането: °C

DOC „x“ часа след вземането: mg/l

Предварителна обработка преди третирането (напр. филтруване, утаяване, престояване и т.н.):

Брой микробни колонии — първоначална проба: колонии/ml

— в началото на изпитването: колонии/ml

Други характеристики:

5. **ОПРЕДЕЛЯНИЯ НА ВЪГЛЕРОД:**

Анализатор на въглерод

	Колба №		DOC след n дни (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Изпитване: подсилена с хранителни съставки морска вода с изпитвано вещество	1	a_1					
		a_2					
		средна стойност, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		средна стойност, $C_{b(t)}$					

▼ M6

	Колба №		DOC след n дни (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Празна проба: подсилена с хранителни съставки морска вода без изпитвано вещество	1	c ₁					
		c ₂					
		средна стойност, C _{c(t)}					
	2	d ₁					
		d ₂					
		средна стойност, C _{d(t)}					
	средна стойност, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. ОЦЕНЯВАНЕ НА НЕОБРАБОТЕНИТЕ ДАННИ

Колба №	Изчисляване на резултатите	% на разграждане след n дни				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Средна стойност (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) D₁ и D₂ не следва да се осредняват, ако има значителна разлика помежду им.

Забележка: Подобни формати могат да се използват когато след разграждането следва специфичен анализ, както и за референтното вещество и за контролите за токсичност.

7. АБИОТИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ (по избор)

	Време (дни)	
	0	t
концентрация на DOC (mg/l) в стерилна контрола	C _{s(0)}	C _{s(t)}

$$\% \text{ abiotic degradation} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

▼ **M6**

Допълнение 3

Изчисляване на теоретичната биохимична потребност от кислород

МЕТОД НА ИЗОЛИРАНИТЕ ПРОБИ

ТПК на веществото $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ с молекулно тегло MW се изчислява според:

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

Това изчисление предполага, че С се минерализира в CO_2 , Н в H_2O , Р в P_2O_5 и Na в Na_2O . Халогенът се отстранява като водороден халогенид, а азотът — като амоняк.

Пример:

Глюкоза $C_6H_{12}O_6$, $MW = 180$

$$ThOD = \frac{16 \left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg } O_2/\text{mg glucose}$$

Молекулните тегла на солите, различни от тези на алкалните метали, се изчислява въз основа на допускането, че солите са хидролизирани.

За сярата се допуска, че се окислява до степен на окисление + 6.

Пример:

Натриев *n*-додецилбензенсулфонат $C_{18}H_{29}SO_3Na$, $MW = 348$

$$ThOD = \frac{16 \left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg } O_2/\text{mg substance}$$

В случай на азотсъдържащи вещества азотът може да бъде отстранен като амоняк, нитрити или нитрати, съответстващи на различни теоретични биохимични потребности от кислород.

$$ThOD_{NO_2} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

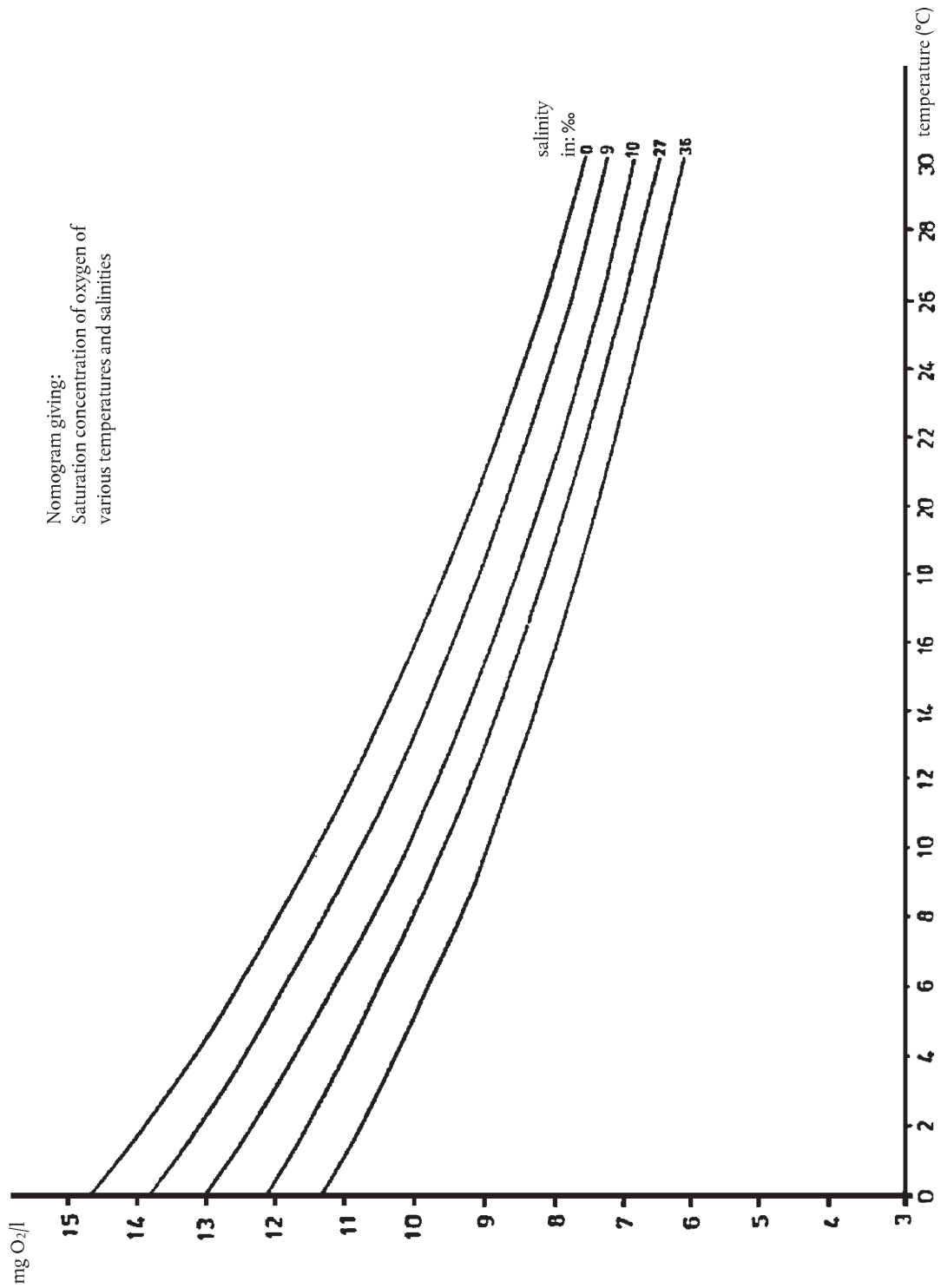
Да предположим, че в случая с вторичен амин при анализа е наблюдавано образуване изцяло на нитрати:

$(C_{12}H_{25})_2NH$, $MW = 353$

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 \left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg } O_2/\text{mg substance}$$

▼ M6

Допълнение 4



▼ **M6**

Допълнение 5

Биоразграждане в морска вода

МЕТОД НА ИЗОЛИРАНИТЕ ПРОБИ

ТАБЛИЦА С ДАННИ

1. **ЛАБОРАТОРИЯ:**
2. **ДАТА НА ЗАПОЧВАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО:**
3. **ИЗПИТВАНО ВЕЩЕСТВО:**

Наименование:

Концентрация на изходния разтвор: mg/l
 Начална концентрация в средата от морска вода: mg/l
 ТПК или ХПК: mg O₂/mg
 изпитвано
 вещество

4. **МОРСКА ВОДА:**

Източник:

Дата на вземане:

Дълбочина на вземане на пробата;

Външен вид в момента на вземане (напр. мътна и т.н.):

Соленост при вземането: ‰
 Температура при вземането: °C
 DOC „x“ часа след вземането: mg/l

Предварителна обработка преди третирането (напр. филтруване, утаяване, престояване и т.н.):

Брой микробни колонии — първоначална проба: колонии/ml
 — началото на изпит- в колонии/ml
 ването

Други характеристики:

5. **СРЕДА ЗА ИЗПИТВАНЕ:**

Температура след аерирането: °C
 Концентрация на O₂ след аериране и преди mg O₂/l
 започване на изпитването:

6. **ОПРЕДЕЛЯНЕ НА РАЗТВОРЕНИЯ КИСЛОРОД:**

Метод: по Winkler/електрод

	Колба №		mg O ₂ /l след n дни			
			0	5	15	28
Изпитване: подсилена с хранителни съставки морска вода с изпитвано вещество	1	a ₁				
	2	a ₂				
	Средна стойност от празна проба	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼ **M6**

	Колба №		mg O ₂ /l след n дни			
			0	5	15	28
Празна проба: подсилена с хранителни съставки морска вода, но без изпитвано вещество	1	c ₁				
	2	c ₂				
	Средна стойност от изпитването	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Забележка: Подобни формати могат да се използват за референтното вещество и за контролите за токсичност.

7. **НАМАЛЯВАНЕ НА РАЗТВОРЕНИЯ КИСЛОРОД: % РАЗГРАЖДАНЕ (%D):**

	Намаляване на разтворения кислород след n дни		
	5	15	28
$(m_b - m_t)^{(1)}$			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)^{(1)}}{testsubstance(mg/l) \times ThOD} \times 100$			

- (¹) При това се допуска, че $m_{b(0)} = m_{t(0)}$, където
- $m_{b(0)}$ = стойност на празната проба на ден 0,
 - $m_{t(0)}$ = стойност на изпитваното вещество на ден 0.
- Ако $m_{b(0)}$ не е равно на $m_{t(0)}$, се използва $(m_{t(0)} - m_{t(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)})$, където
- $m_{b(x)}$ = стойност на празната проба на ден x,
 - $m_{t(x)}$ = стойност на изпитваното вещество на ден x.

▼ M6

В.43. АНАЕРОБНА БИОРАЗГРАДИМОСТ НА ОРГАНИЧНИ ВЕЩЕСТВА В РАЗГРАДЕНА УТАЙКА: ЧРЕЗ ИЗМЕРВАНЕ НА ПОЛУЧАВАНЕТО НА ГАЗ

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 311 (2006). Съществуват редица скринингови тестове за оценка на аеробната биоразградимост на органични вещества (методи за изпитване В.4, В.9, В.10 и В.11 (1), и насоки на ОИСП TG 302С (2)) и резултатите от прилагането на същите са били успешно използвани за прогнозиране на съдбата на вещества в аеробна среда, особено в аеробните етапи на пречистване на отпадъчните води. Различни пропорции неразтворими във вода вещества, както и такива, които се адсорбират върху твърди вещества от отпадъчните води, също се пречистват в аеробна среда, тъй като те присъстват в утаени отпадъчни води. Независимо от това, по-големите части от тези вещества са свързани с първичната утаена утайка, която е отделена от непречистените отпадъчни води в резервоари за утаяване преди утаените отпадъчни води или супернатантът да бъдат пречистени в аеробна среда. След това утайката, съдържаща някои от разтворимите вещества в интерстициалната течност, след това се пропуска в нагрети реактори за анаеробно разграждане. Все още не съществуват изпитвания в тази серия за оценка на биоразградимостта в анаеробни условия в анаеробни реактори и с това изпитване се цели да бъде запълнена тази празнина; то не е задължително приложимо по отношение на други безкислородни компоненти на околната среда.
2. Респирометричните техники за измерване на получени количества газ при анаеробни условия, предимно метан (CH_4) и въглероден диоксид (CO_2), са успешно използвани за оценка на биоразградимостта в анаеробни условия. Birch et al (3) преразгледаха тези процедури и стигнаха до заключение, че работата на Shelton and Tiedje (4), основана на по-ранни проучвания (5)(6)(7), е най-всеобхватна. Този метод (4), който бе доразвит от други (8) и стана част от стандартите на САЩ (9) (10), не реши проблемите, свързани с различната разтворимост на CO_2 и CH_4 в средата за изпитване, и с изчисляването на теоретичното получаване на газ на дадено изпитвано вещество. Докладът ЕСЕТОС (3) препоръча допълнително измерване на съдържанието на разтворен неорганичен въглерод (DIC) в супернатантната течност, което направи техниката по-широко приложима. Методът ЕСЕТОС беше обект на международни действия по калибриране (или кръгово изпитване) и се превърна в ISO стандарт 11734 (11).
3. Настоящият метод за изпитване, основаващ се на ISO 11734 (11), описва скринингов метод за оценка на потенциалната анаеробна биоразградимост на органични вещества при специфично условие (т.е. в анаеробен реактор в даден момент и диапазон от концентрации на микроорганизми). Тъй като се използва разредена утайка със сравнително висока концентрация на изпитваното вещество и продължителността на изпитването обикновено е по-голяма от времето на задържане на утайката в анаеробните реактори, условията на изпитването не отговарят непременно на условията в анаеробните реактори, нито пък това изпитване е приложимо за оценката на анаеробната биоразградимост на органични вещества при различни условия на околната среда. Утайката се експонира на изпитваното вещество за период до 60 дни, който е по-дълъг от нормалното време на задържане на утайката (25 до 30 дни) в анаеробните реактори, макар че в промишлени обекти времена на задържане могат да бъдат много по-дълги. Прогнозите от резултатите от това изпитване не могат да бъдат направени толкова убедително, както при биоразграждане в аеробни условия, тъй като са натрупани много доказателства за поведението на изпитвани вещества в „готови“ изпитвания в аеробни условия и в изпитвания за симулиране, и аеробната среда е достатъчна за увереността, че съществува връзка; съществуват малко подобни доказателства за анаеробната среда. Може да се допусне, че е налице пълно анаеробно биоразграждане, ако се постигне 75—80 % от теоретичното получаване на газ. Високите съотношения на вещество към биомаса, използвани при тези изпитвания, означават, че за вещество, което премине, е по-вероятно да се разгражда в анаеробен реактор. Освен

▼ M6

това веществата, които не могат да бъдат преобразувани в газ при изпитването, не са непременно устойчиви при съотношения на вещество към биомаса, които са по-близки до действителните в околната среда. Също така, протичат други анаеробни реакции, чрез които веществата могат да бъдат най-малко частично разградени, напр. дехлориране, но това изпитване не открива такива реакции. Независимо от това, чрез прилагане на специални аналитични методи за определяне на изпитваното вещество, неговото отстраняване може да се следи (вж. точки 6, 30, 44 и 53).

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

4. Промита разградена утайка⁽¹⁾, съдържаща ниски (< 10 mg/l) концентрации на неорганичен въглерод (IC), се разрежда приблизително десетократно до обща концентрация на твърди вещества от 1 g/l до 3 g/l и се инкубира при 35 °C ± 2 °C в херметично затворени съдове с изпитваното вещество с 20 до 100 mg C/l за период до 60 дни. Дава се възможност за измерване активността на утайката чрез изпитване на паралелни празни контроли с инокулум от утайка в средата, но без изпитвано вещество.
5. Измерва се увеличението на налягането в парното пространство в съдовете, произтичащо от получаването на въглероден диоксид и метан. При условията на изпитването голяма част от получения CO₂ ще бъде разтворен в течната фаза или преработен в карбонат или водороден карбонат. Този неорганичен въглерод се измерва в края на изпитването.
6. Количеството въглерод (неорганичен, плюс метан), получено в резултат на биоразграждането на изпитваното вещество, се изчислява от нетното количество получен газ и нетното образуване на неорганичен въглерод в течната фаза, превишаващи стойностите на празните контроли. Степента на биоразграждане се изчислява от получения общия неорганичен въглерод и въглерода в метана като процент от измереното или изчислено количество въглерод, добавен като изпитвано вещество. Процесът на биоразграждане може да бъде следен чрез извършване на междинни измервания само на получаването на газ. Освен това първичното биоразграждане може да се определи чрез специфични анализи в началото и в края на изпитването.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНОВОТО ВЕЩЕСТВО

7. Необходимо е да са известни чистотата, водоразтворимостта, летливостта и адсорбционните характеристики на изпитваното вещество, за да е възможно да се извърши правилно тълкуване на резултатите. Трябва да се установи — от химичната структура или от измерване — съдържанието на органичен въглерод (% w/w) на изпитваното вещество. За летливите изпитвани вещества измерената или изчислената стойност на константата от закона на Хенри може да е от полза при вземане на решение дали изпитването е приложимо. За избора на подходяща концентрация на изпитване и за тълкуването на резултатите, показващи слаба биоразградимост, е полезно да се разполага с информация за токсичността на изпитваното вещество за анаеробните бактерии. Препоръчва се да се включи контрола за потискането, освен ако не е известно, че изпитваното вещество не потиска активността на анаеробните микроорганизми (вж. точка 21 и ISO 13641-1 (12)).

⁽¹⁾ Разградената утайка е смес от утаените фази на отпадъчните води и активна утайка, които са били инкубирани в анаеробен реактор при около 35 °C за намаляване на биомасата и на проблемите, свързани с миризмите, и за улесняване на обезводняването на утайката. Състои се от асоциация на анаеробни ферментационни и метаногенни бактерии, произвеждащи въглероден диоксид и метан (11).

▼ **M6**

ПРИЛОЖИМОСТ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

8. Методът за изпитване може да се прилага за водоразтворими вещества; той може да се прилага също така за малко разтворими и неразтворими вещества, при условие че се използва метод за точно дозиране, вж. напр. ISO 10634 (13). За летливи вещества като цяло е необходимо решение за всеки конкретен случай. Може да е необходимо да бъдат предприети специални мерки, например с цел да не се отделя газ по време на изпитването.

РЕФЕРЕНТНИ ВЕЩЕСТВА

9. За да се провери процедурата се изпитва референтно вещество чрез паралелно приготвяне на подходящи съдове като част от нормалните провеждания изпитването; Като пример могат да бъдат дадени фенол, натриев бензоат и полиетиленгликол 400, от които би се очаквало да се разградят с повече от 60 % от теоретичното получаване на газ (т.е. метан и неорганичен въглерод) в рамките на 60 дни (3)(14).

ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

10. В международно кръгово изпитване (14) е имало добра възпроизводимост при измерванията на налягането на газ между съдове с трикратни повторения. Относителното стандартно отклонение (коэффициент на вариация, COV) като цяло е било под 20 %, въпреки че тази стойност често се е увеличавала > 20 % в присъствието на токсични вещества или към края на 60-дневния период на инкубация. Установени са също така и по-високи отклонения в съдове с обем < 150 ml. Крайните стойности на pH за изпитваните среди са били в диапазона 6,5-7,0.
11. При кръговото изпитване са получени следните резултати.

Изпитвано вещество	Общи данни n ₁	Средно разграждане (от общите данни) (%)	Относително стандартно отклонение (от общите данни) (%)	Валидни данни n ₂	Средно разграждане (от валидните данни) (%)	Относително стандартно отклонение (от валидните данни) (%)	Данни > 60 % разграждане във валидни изпитвания n ₃
Палмитинова киселина	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Полиетиленгликол 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Относителен дял на n₂

12. Коефициентите на вариация на средната за всички стойности, получени при палмитинова киселина и полиетиленгликол 400, са били 45 % (n = 36) и 35 % (n = 38). При игнориране на стойностите < 40 % и > 100 % (за първите се допуска, че се дължат на неоптимални условия, а последните — на неизвестни причини) COV са били намалени съответно на 26 % и 23 %. Делът на „валидните“ стойности, при които се достига минимум 60 % разграждане, е бил 70 % за палмитинова киселина и 83 % за полиетиленгликол 400. Съотношенията на процента на биоразграждане, получени от измервания на DIC, са били относително ниски, но са варирали. За палмитинова киселина интервалът е бил 0-35 % със средна стойност 12 % и COV 92 %, а за полиетиленгликол 400 интервалът е бил 0-40 %, средно 24 % и COV 54 %.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ

Апаратура

13. Изисква се използване на стандартно лабораторно оборудване, както и на следното:
- a. Инкубатор — безисков и контролиран при 35 °C ± 2 °C;

▼ **M6**

- б. Устойчиви на високо налягане стъклени съдове за изпитване с подходящ номинален размер ⁽¹⁾, всеки от които снабден със септа с газонепроницаемо покритие, издържаща около 2 bar. Парното пространство трябва да е между 10 % и 30 % от общия обем. Ако биогазът се освобождава редовно, подходящата стойност е около 10 % обем на парното пространство, но ако освобождаването на газ се извършва само в края на изпитването, подходящата стойност е 30 %. Когато налягането се освобождава при всяко време на пробовземане, препоръчват се стъклени серумни бутилки с номинален обем 125 ml, с действителен обем от около 160 ml, херметично затворени със септи ⁽²⁾ за серумни бутилки и алуминиеви капачки във формата на пръстени;
- в. Уред за измерване на налягане ⁽³⁾, приспособен за измерване и пропускане на получените газове, например ръчен прецизен манометър, свързан с подходяща игла от спринцовка; 3-пътен газонепроницаем клапан позволява изпускане на надналягането (допълнение 1). Необходимо е вътрешният обем в тръбите на преобразувателя на налягането и клапана да се запази колкото е възможно по-малък, така че грешките от пренебрегването на обема на оборудването да не са значими;

Забележка — показанията за налягането се използват директно за изчисляване на количеството въглерод, получен в парното пространство (точки 42-44). Като алтернатива, показанията за налягането могат да бъдат превърнати в обеми (при температура 35 °C, атмосферно налягане) получен газ, чрез графика за преобразуване. Тази графика се построява въз основа на данни, получени чрез инжектиране на предварително известни количества азот в серия от съдове за изпитване (напр. серумни бутилки) при $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ и записване на получените стабилизирани показания за налягането (виж допълнение 2). Изчислението е показано в бележката в точка 44.

Предупреждение — следва да се обърне внимание с оглед избягване на убождане с игли при използването на микроспринцовки.

- г. Анализатор на въглерод, подходящ за директно определяне на неорганичен въглерод в интервала от 1 mg/l до 200 mg/l;
- д. високоточни спринцовки за пробите от газове и течности;
- е. Магнитни бъркалки и магнитни пръчици за разбъркване (по избор);
- ж. Защитна камера с ръкавици (препоръчително).

Реактиви

14. Навсякъде се използват само реактиви с квалификация „чист“.

⁽¹⁾ Препоръчителният обем е от 0,1 до 1 литър.

⁽²⁾ Препоръчва се употребата на газонепроницаеми силиконови септи. Освен това се препоръчва изпитване на херметичността на септите, особено направените от бутилов каучук, тъй като няколко от наличните в търговската мрежа не са достатъчно газонепроницаеми срещу метан, а някои септи не остават плътно прилепени след пробиване с игла при условията на изпитването.

⁽³⁾ Устройството трябва да се използва и калибрира на редовни интервали от време в съответствие с инструкциите на производителя. Ако се използва манометър с предписаното качество, напр. капсулиран със стоманена мембрана, не е необходимо калибриране в лабораторията. Точността на калибрирането може да бъде проверена в лабораторията с едноточково измерване при $1 \times 10^5 \text{ Pa}$ спрямо манометър с механичен дисплей. Ако тази точка е измерена правилно, линейността също ще бъде непроменена. При използване на други измервателни устройства (без сертифицирано калибриране от производителя) се препоръчва калибриране за целия диапазон на редовни интервали.

▼ **M6****Вода**

15. Дестилирана или дейонизирана вода (от която кислородът е отстранен чрез барботиране с азот, съдържащ по-малко от 5 µl/l кислород), съдържаща по-малко от 2 mg/l разтворен органичен въглерод (DOC).

Среда за изпитване

16. Средата за разреждане трябва да бъде изготвена така, че да съдържа следните съставки в посочените количества:

безводен калиев дихидрогенфосфат (KH_2PO_4)	0,27 g
динатриев хидрогенфосфат додекахидрат ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	1,12 g
амониев хлорид (NH_4Cl)	0,53 g
калциев хлорид дихидрат ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,075 g
магнезиев хлорид хексахидрат ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,10 g
железен(II) хлорид тетрахидрат ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,02 g
ресазурин (индикатор за кислород)	0,001 g
натриев сулфид нонахидрат ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	0,10 g
изходен разтвор на микроелементи (по избор, точка 18)	10 ml
Добавя се вода, от която е отстранен кислородът (точка 15)	до 1 литър

Забележка: Следва да бъде използван пряно доставен натриев сулфид, или същият следва да бъде промит и изсушен преди употреба, с цел да се осигури достатъчна редукиционна способност. Изпитването може да се извърши без използването на защитна камера с ръкавици (вж. точка 26). В този случай крайната концентрация на натриев сулфид в средата следва да се увеличи до 0,20 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ на литър. Натриев сулфид може също да се добави от подходящ анаеробен изходен разтвор през септата на затворените бутилки за изпитване, тъй като тази процедура ще доведе до намаляване на риска от окисление. Натриевият сулфид може да се замени с титанов(III) цитрат, който се добавя през септата на затворените съдове за изпитване при крайна концентрация от 0,8 до 1,0 mmol/l. Титановият(III) цитрат е високо ефективен и ниско токсичен редутор, който се изготвя, както следва: Разтварят се 2,94 g тринатриев цитрат дихидрат в 50 ml вода без съдържание на кислород (което води до 200 mmol/l разтвор) и се добавят 5 ml 15 % (w/v) разтвор на титанов(III) хлорид. Неутрализира се до pH $7 \pm 0,2$ с неорганични вещества с алкален характер и се поставя в подходящ съд под струя от газообразен азот. Концентрацията на титановия(III) цитрат в този изходен разтвор е 164 mmol/l.

17. Смесват се компонентите на средата за изпитване, с изключение на редутора (натриев сулфид, титанов цитрат) и в разтвора се барботира азот за около 20 минути непосредствено преди употреба, за да се отстрани кислородът. След това се добавя подходящият обем от пряно приготвен разтвор на редутора (приготвен във вода, от която е отстранен кислородът) непосредствено преди използването на средата. Кorigира се pH на средата на $7 \pm 0,2$, при необходимост с разрежена неорганична киселина или вещество с алкален характер.

▼ M6**Изходен разтвор на микроелементи (по избор)**

18. Препоръчва се средата за изпитване да съдържа следните микроелементи за подобряване на процесите на разграждане в анаеробни условия, особено при използване на ниски концентрации (напр. 1 g/l) на инокулума (11).

Манганов хлорид тетрахидрат ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	50 mg
Борна киселина (H_3BO_3)	5 mg
Цинков хлорид (ZnCl_2)	5 mg
Меден(II) хлорид (CuCl_2)	3 mg
Динатриев молибдат дихидрат ($(\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$)	1 mg
Кобалтов хлорид хексахидрат ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	100 mg
Никелов хлорид хексахидрат ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	10 mg
Динатриев селенит (Na_2SeO_3)	5 mg

Добавя се вода, от която е отстранен кислородът (точка 15) до 1 литър

Изпитвано вещество

19. Добавя се изпитваното вещество като изходен разтвор, суспензия, емулсия или пряко в твърдо или течно състояние, или абсорбирано върху филтър от стъклено влакно, за да се получи концентрация не повече от 100 mg/l органичен въглерод. Ако са използвани изходни разтвори се приготвя подходящ разтвор с вода (от която кислородът е предварително отстранен чрез барботиране с азот) (точка 15) с такова съдържание, че добавеният обем да е по-малко от 5 % от общия обем на реакционната смес. Стойността на рН на изходния разтвор се коригира до $7 \pm 0,2$ ако е необходимо. За изпитвани вещества, които не са достатъчно разтворими във вода, вж. ISO 10634 (13). Ако се използва разтворител, приготвя се допълнителна контрола, само с добавен в инокулираната среда разтворител. Органичните разтворители, за които се знае, че потискат получаването на метан, като хлороформът и тетрахлорометанът, следва да се избягват.

Предупреждение — с токсичните изпитвани вещества и с тези, чиито свойства не са известни, следва да се борави внимателно.

Референтни вещества

20. Референтни вещества, като например натриев бензоат, фенол и полиетиленгликол 400, са били успешно използвани за проверка на процедурата, като са показали биоразграждане над 60 % в рамките на 60 дни. Приготвя се изходен разтвор (във вода, от която е отстранен кислородът) от избраното референтно вещество, по същия начин, както за изпитваното вещество и, ако е необходимо, се коригира до рН $7 \pm 0,2$.

Контрола за потискане (при условие)

21. За да се получи информация за токсичността на изпитваното вещество към анаеробни микроорганизми за напирание на най-подходящата изпитвана концентрация, се добавя изпитваното вещество и референтно вещество в съд със средата за изпитване (вж. точка 16), всяко съответно в концентрациите, в които е било добавено в средата за изпитване при изпитването (вж. точки 19 и 20 и вж. също ISO 13641-1 (12)).

▼ M6**Разградена утайка**

22. Взема се разградена утайка от реактор в пречиствателна станция, която пречиства главно битови отпадъчни води. Утайката трябва да бъде напълно охарактеризирана и нейната основна информация следва да бъде протоколирана (вж. точка 54). Ако съществува намерение за използване на адаптиран инокулум, може да бъде взета под внимание разградена утайка от станция за пречистване на промишлени отпадъчни води. За вземане на разградената утайка се използват бутилки с широко гърло, изработени от полиетилен висока плътност или подобен материал, с възможност за разширяване. Добавя се утайка до около 1 cm от горната част на бутилките и същите се затварят херметично, за предпочитане с предпазен клапан. След транспортиране до лабораторията взетата утайка може да се използва директно или да се постави в лабораторен реактор. Прекомерното количество биогаз се освобождава чрез внимателно отваряне на бутилките с утайката. Алтернативно, като източник на инокулум може да се използва получена в лабораторни условия анаеробна утайка, но нейният спектър на действие може да е намален.

Предупреждение — от разградената утайка се получават запалими газове, които създават рискове от пожар и експлозия: тя също така съдържа потенциално патогенни организми и следователно при работата с утайката трябва да се вземат подходящи предпазни мерки. Поради причини, свързани с безопасността, за вземане на утайката не се използват стъклени съдове.

23. С цел да се намали фоновото получаване на газ и за намаляване на влиянието на празните контроли може да бъде взето под внимание предварително разграждане на утайката. Ако се изисква предварително разграждане, утайката трябва да бъде оставена до 7 дни да се разгради без добавяне на никакви хранителни вещества или субстрати, при $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. За няколко изпитвани вещества е установено, че предварително разграждане за около 5 дни обикновено осигурява оптимален спад в получаването на газ в празната проба без неприемливо увеличаване на латентния или инкубационния период по време на етапа на изпитване, и без загуба на активност.
24. За изпитвани вещества, които са, или се очаква да бъдат слабо биоразградими, се разглежда евентуална предварителна експозиция на утайката на изпитваното вещество, за да се получи инокулум, който да е по-добре приспособен. В такъв случай изпитваното вещество се добавя с концентрация на органичен въглерод от 5 mg/l до 20 mg/l към разградената утайка и се инкубира за максимум 2 седмици. Предварително експонираната утайка се промива внимателно преди употреба (вж. точка 25) и в протокола от изпитването се посочват условията на предварителната експозиция.

Инокулум

25. Утайката се промива (вж. точки 22-24) непосредствено преди употреба, за намаляване на концентрация на неорганичен въглерод на по-малко от 10 mg/l в крайната изпитвана суспензия. Утайката се центрофугира в херметично затворени епруветки (напр. 3 000 g за 5 минути) и супернатантът се отстранява. Получената пелета се суспендира повторно в среда, от която е отстранен кислородът (точки 16 и 17), суспензията се центрофугира повторно и течният супернатант се отстранява. Ако неорганичният въглерод не е бил достатъчно намален, процедурата по промиване на утайката може да се повтори още само до два пъти. Това, както изглежда, не засяга неблагоприятно микроорганизмите. Накрая, пелетата се суспендира в необходимия обем от среда за изпитване и се определя общата концентрация на твърди вещества [напр. ISO 11923 (15)]. Общо крайната концентрация на твърди вещества в съдовете за изпитване трябва да бъде в интервала от 1 g/l до 3 g/l (или около 10 % от тази в неразредена разградена утайка). Горепосаните операции се провеждат по такъв начин, че утайката да има минимален контакт с кислород (напр. с използване на азотна атмосфера).

▼ **M6****ПРОЦЕДУРА НА ИЗПИТВАНЕ**

26. Изпълняват се следните първоначални процедури, с използване техники за поддържане на възможно най-малък контакт между разградената утайка и кислорода; например, може да е наложително да се работи в защитна камера с ръкавици в азотна атмосфера и/или бутилките да се прочистят с азот (4).

Приготвяне на съдовете за изпитване и на контролите

27. Приготвят се съдове за изпитване в най-малко три повторения (вж. точка 13, б) за изпитваното вещество, празните контроли, референтното вещество, контролите за потискане (при условие) и камерите за регулиране на налягането (процедура по избор) (вж. точки 7 и 19-21). Могат също така да се приготвят допълнителни съдове за оценка на първичното биоразграждане, като се използват специфични анализи за изпитваното вещество. Един и същ набор от празни контроли може да се използва за множество изпитвани вещества по време на едно и също изпитване, при условие че парното пространство е в съответствие с условията.
28. Разределеният инокулум се приготвя преди да бъде добавен към съдовете, например с помощта на пипета с широк отвор. Аликвотни части от добре разбъркан инокулум (точка 25) се добавят така, че общата концентрация на твърди вещества да е една и съща във всички съдове (между 1 g/l и 3 g/l). Добавят се изходни разтвори на изпитваното и референтното вещества, след корекция до стойност на рН $7 \pm 0,2$, ако е необходима. Изпитваното вещество и референтното вещество следва да бъдат добавени, като се използва най-подходящият път на прилагане (точка 19).
29. Изпитваната концентрация на органичния въглерод, обикновено следва да бъде между 20 и 100 mg/l (точка 4). Ако изпитваното вещество е токсично, изпитваната концентрация трябва да се намали до 20 mg C/l или дори по-малко, ако се измерва само първичната биоразградимост чрез специфични анализи. Следва да се отбележи, че варирането на резултатите от изпитването се увеличава при по-ниски концентрации на изпитване.
30. В съдовете с празни проби се добавя еквивалентно количество от носителя, използван за дозиране на изпитваното вещество вместо изходен разтвор, суспензия или емулсия. Ако изпитваното вещество се прилага с използването на филтри от стъкло влакно или органични разтворители, към празните проби се добавя филтър или обем разтворител, еквивалентен на изпарения се. Приготвя се допълнително повторение с изпитваното вещество за измерването на стойността на рН. Ако е необходимо, стойността на рН се коригира до $7 \pm 0,2$, като се разрежда с малки количества разрежена неорганична киселина или вещество с алкален характер. Същите количества неутрализиращи вещества следва да се добавят към всички съдове за изпитване. Не би следвало да се налага да се правят такива добавки, тъй като стойностите на рН на изходните разтвори на изпитваното вещество и на референтното вещество вече са били коригирани (вж. точки 19 и 20). Ако следва да се измерва първичното биоразграждане, трябва да се вземе подходяща проба от съда с контролата за рН, или от допълнителен съд за изпитване, и концентрацията на изпитваното вещество следва да се измерва с използване на специфични анализи. Към всички съдове могат да се добавят магнити с покритие, ако реакционните смеси трябва да се разбъркват (по избор).
31. Следва да се гарантира, че общият обем течност V_1 и обемът на парното пространство V_H са едни и същи във всички съдове; Стойностите на V_1 and V_H се отбелязват и записват. Всеки съд следва да бъде херметично затворени със септа с газонепроницаемо покритие и прехвърлен от защитната камера с ръкавици (вж. точка 26) в инкубатора (вж. точка 13, а)).

▼ M6

Неразтворими изпитвани вещества

32. Претеглени количества от вещества, които са малко разтворими във вода, се добавят направо в приготвените съдове. Когато е необходимо използването на разтворител (вж. точка 19), разтворът или суспензията на изпитваното вещество се прехвърля в празните съдове. Когато е възможно, разтворителят се изпарява чрез прекарване на газообразен азот през съдовете, и след това се добавят останалите съставки, а именно разредена утайка (точка 25) и вода, от която е отстранен кислородът, съгласно изискванията. Следва също така да бъде подготвена допълнителна контрола на разтворител (вж. точка 19). За други методи за добавяне на неразтворими вещества може да се направи справка с ISO 10634 (13). Течните изпитвани вещества могат да се дозират със спринцовка в напълно приготвени херметично затворени съдове, ако се очаква, че първоначалната стойност на рН не надвишава 7 ± 1 — в противен случай дозирането се извършва както е описано по-горе (вж. точка 19).

Инкубиране и измервания на налягането на газовете

33. Приготвените съдове се инкубират при $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ за около 1 час, за да се позволи достигане на равновесие и излишъкът от газове да бъде освободен в атмосферата, например чрез разклащане на всички съдове един след друг, вкарване на иглата на манометъра (точка 13, в)) през запушалката и отваряне на клапана, докато манометърът отчете нулева стойност. Ако на този етап, или когато се правят междинни измервания, налягането в парното пространство е по-ниско от атмосферното, следва да се подаде газообразен азот, за да се възстанови атмосферното налягане. Клапанът се затваря (вж. точка 13, в)) и се продължава с инкубирането на тъмно, като се гарантира, че всички части на съдовете се поддържат при температурата на разграждането. Съдовете се наблюдават след инкубирането в продължение на 24 до 48 часа. Съдовете се отхвърлят, ако съдържанието на съдовете показва ясно розово оцветяване в супернатанта, т.е. ако ресазуринът (вж. точка 16) е променил цвета си, показвайки наличие на кислород (вж. точка 50). Въпреки че малки количества кислород могат да бъдат толерирани от системата, по-високи концентрации могат сериозно да потиснат хода на биоразграждането в анаеробни условия. Отхвърлянето на случаен отделен съд от набора от три повторения може да бъде прието, но по-голяма честота на неуспехите трябва да води до проучване на опитните процедури, както и до повтаряне на изпитването.
34. Съдържанието на всеки съд се смесва внимателно чрез бъркане или чрез разклащане в продължение на няколко минути поне 2 или 3 пъти седмично и малко преди всяко измерване на налягането. Разклащането суспендира повторно инокулума и гарантира равновесието в газовата фаза. Всички измервания на налягането следва да бъдат извършвани бързо, тъй като в съдовете за изпитване може да настъпи понижаване на температурата, водещо до неверни показания. При измерването на налягането целият съд за изпитване, включително парното пространство, следва да бъде поддържан при температурата на разграждането. Налягането на газа се измерва, например, чрез вкарване през септата на иглата от спринцовка, прикрепена към манометъра (точка 12, в)). Следва да се вземат мерки за предотвратяване на навлизането на вода в иглата от спринцовка; ако това се случи, трябва мокрите части да бъдат подсушени и да се постави нова игла. Налягането трябва да се измерва в mbar (вж. точка 42). Налягането на газовата фаза в съдовете може да се измерва периодично, например седмично и, по избор, излишъкът от газове се освобождава в атмосферата. Като алтернатива, налягането се измерва само в края на изпитването, за да се определи количеството на получения биогаз.
35. Препоръчва се да се извършват междинни замервания на налягането на газовата фаза, тъй като повишаването на налягането предоставя насоки кога може да бъде приключено изпитването и позволява наблюдаването на кинетиката (вж. точка 6).

▼ **M6**

36. Изпитването обикновено се прекратява след инкубационен период от 60 дни, освен в случаите когато кривата на биоразграждането, получена от измерването на налягането, е достигнала фазата на плато преди това; това е фазата, в която е достигнато максимално разграждане и кривата на биоразграждане е изравнена. Ако стойността във фазата на плато е по-малка от 60 %, интерпретирането е проблематично, тъй като тази стойност сочи, че само част от молекулата е минерализирана, или че е направена грешка. Ако в края на нормалния период на инкубация се получават газове, но очевидно не е достигната фаза на плато, следва да се разгледа удължаване на срока на изпитването, за да се провери дали фазата на плато (> 60 %) ще бъде достигната.

Измерване на неорганичен въглерод

37. В края на изпитването, след последното измерване на налягането на газовете, утайката се оставя да се утаи. Всички съдове се отварят един след друг и незабавно се взема проба за определяне на концентрацията (mg/l) на неорганичен въглерод в течния супернатант. Към течния супернатант не трябва да се прилага нито центрофугиране, нито филтруване, тъй като това би довело до неприемлива загуба на разтворен въглероден диоксид. Ако течността не може да бъде анализирана в момента, в който е взета проба от нея, тя се съхранява до 2 дни в херметично затворен флакон без парно пространство и охладена до температура от около 4 °C. След измерването на неорганичния въглерод се измерва и се записва стойността на рН.
38. Като алтернатива, неорганичният въглерод в супернатанта може да се определи косвено чрез отделянето на разтворения неорганичен въглерод под формата на въглероден диоксид, който може да бъде измерен в парното пространство. След последното измерване на налягането на газовете, налягането във всички съдове за изпитване се коригира до изравняване с атмосферното налягане. Съдържанието на всеки съд се подкиселява приблизително до рН 1 чрез добавяне на концентрирана неорганична киселина (напр. H₂SO₄) през септата на херметично затворените съдове. Разклатените съдове се инкубират при 35 °C ± 2 °C в продължение на приблизително 24 часа и се измерва с манометър налягането на газовете, получено в резултат на отделения въглероден диоксид.
39. Сходни замервания се извършват за съответните празни проби, референтни вещества и, ако са включени, съдовете с контроли за потискане (вж. точка 21).
40. В някои случаи, особено когато същите съдове с контроли се използват за изпитване на няколко изпитвани вещества, трябва да бъдат взимани предвид измервания на междинните концентрации на неорганичен въглерод в съдовете за изпитване и в съдовете с контроли, когато това е подходящо. В този случай трябва да бъде приготвен достатъчен брой съдове за всички междинни измервания. Настоящата процедура е за предпочитане пред вземането на всички проби само от един съд. Последното може да се извършва само при условие, че обеят, необходим за анализ на DIC, не се счита за прекомерно голям. Измерването на DIC трябва да бъде направено след измерването на налягането на газовете без освобождаване на излишъка от газове, както е описано по-долу:
- вземат се проби от супернатанта с възможно най-малък обем, с помощта на спринцовка през септата и без отваряне на съдовете, и се определя неорганичният въглерод в пробата;
 - след вземането на пробата излишъкът от газове се освобождава, или не;
 - следва да се има предвид, че дори малко намаление в обема на супернатанта (напр. около 1 %) може да доведе до значително увеличение на обема на газовете в парното пространство (V_h);
 - уравненията (вж. точка 44) се коригират чрез увеличаване на V_h в уравнение 3, когато е необходимо.

▼ **M6****Специфични анализи**

41. Ако трябва да се определи първичното разграждане при анаеробни условия (виж точка 30), от съдовете, съдържащи изпитваното вещество, в началото и в края на изпитването се взема проба с подходящ обем за специфични анализи. Ако бъде извършено това, се отбелязва, че обемите на парното пространство (V_h) и на течността (V_l) ще се променят, и това се взема под внимание при изчисляването на резултатите от получаването на газове. Като алтернатива могат да се вземат проби за специфични анализи от допълнителни смеси, които преди това са приготвени за тази цел (точка 30).

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Обработка на резултатите**

42. По практически причини, налягането на газовете се измерва в милибари ($1 \text{ mbar} = 1 \text{ h Pa} = 10^2 \text{ Pa}$; $1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/m}^2$), обемът — в литри, а температурата — в градуси по Целзий.

Въглерод в парното пространство

43. Тъй като както в 1 mol метан, така и в 1 mol въглероден диоксид, се съдържат по 12 g въглерод, масата на въглерода в даден обем на отделените газове може да бъде изразена като:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Уравнение [1]}$$

където:

m = маса на въглерода (mg) в даден обем на отделения газ;

12 = относителна атомна маса на въглерода;

n = брой молове газ в дадения обем.

Ако в значителни количества се получава газ, различен от метан или въглероден диоксид (напр. N_2O), формулата [1] следва да бъде изменена, за да се опише възможността за въздействия от получените газове.

44. От законите за газовете n може да бъде изразено като:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Уравнение [2]}$$

където:

p = налягане на газовете (Pa);

V = обема на газовете (m^3);

R = моларна газова константа [$8,314 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$];

T = температура на инкубирането (K).

Чрез комбинация от уравнение [1] и [2] и рационализиране, за да се даде възможност за получаване на газ в празните контроли:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0,1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Уравнение [3]}$$

където:

m_h = маса на нетния въглерод, получен като газове в парното пространство (mg);

Δp = средна стойност на разликата между началното и крайното налягане в съдовете за изпитване, минус съответстващата средна стойност в съдовете с празни проби (mbar);

▼ **M6**

V_h = обем на парното пространство в съда (l);

0,1 = преобразуване както на N/m^2 в mbar, така и на m^3 в литри.

Уравнение [4] следва да бъде използвано за нормалната температура на инкубиране от 35 °C (308 K):

$$m_h = 0,468(\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Уравнение [4]}$$

Забележка: Алтернативно изчисляване на обема. Показанията на манометъра трябва да се преобразуват в ml газове, получени при използване на стандартната крива, генерирана чрез начертване на инжектирания обем (ml) спрямо показанията на манометъра (допълнение 2). Броят молове (n) газове в парното пространство на всеки съд се изчислява като се раздели кумулативното получаване на газове (ml) на 25 286 ml/mol, което е обемът, заеман от един mol газове при 35 °C и стандартно атмосферно налягане. Тъй като както в 1 mol CH_4 , така и в 1 mol CO_2 , се съдържа по 12 g въглерод, количеството на въглерода (m, mg) в парното пространство (m_h) се дава от уравнение [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Уравнение [5]}$$

Рационализиране, за да се даде възможност за получаване на газ в празните контроли:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0,475\Delta V \quad \text{Уравнение [6]}$$

където:

m_h = маса на нетния въглерод, получен като газове в парното пространство (mg);

ΔV = средна стойност на разликата между обема получени газове в парното пространство в съдовете за изпитване и в съдовете с празна проба;

25286 = обем, заеман от 1 mol газ при 35 °C, 1 атмосфера.

45. Процесът на биоразграждането може да бъде последван от начертване на кумулативното нарастване на налягането Δp (mbar) спрямо времето, ако това е целесъобразно. От тази крива се идентифицира и се записва латентната фаза (дни). Латентната фаза е периодът от началото на изпитването до започването на значимо разграждане (вж. напр. допълнение 3). Ако са взети и анализирани междинни проби от супернатант (виж точки 40, 46 и 47), тогава вместо единствено кумулативното налягане може да бъде начертан общият получен въглерод (в газовата фаза плюс този в течната фаза).

Въглерод в течността

46. Количеството метан в течността се пренебрегва, тъй като е известно, че разтворимостта му във вода е много малка. Масата на неорганичния въглерод в течността в съдовете за изпитване се изчислява, като се използва уравнение [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Уравнение [7]}$$

където:

m_l = маса на неорганичния въглерод в течността (mg);

C_{net} = концентрация на неорганичния въглерод в съдовете за изпитване, минус тази в съдовете с контролите в края на изпитването (mg/l);

V_l = обем на течността в съда (l);

▼ M6**Общ въглерод в газове**

47. Общата маса на въглерода в газовете в съда се изчислява, като се използва уравнение [8]:

$$m_t = m_h + m_l \quad \text{Уравнение [8]}$$

където:

m_t = обща маса на въглерода в газовете (mg);

m_h и m_l са както са определени по-горе.

Въглерод от изпитваното вещество

48. Масата на въглерода в съдовете за изпитване, получена от добавеното изпитвано вещество, се изчислява, като се използва уравнение [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \quad \text{Уравнение [9]}$$

където:

m_v = маса на въглерода от изпитваното вещество (mg)

C_c = концентрация на въглерода от изпитваното вещество в съдовете за изпитване (mg/l)

V_l = обем на течността в съда за изпитване (l).

Степен на биоразграждане

49. Процентът на биоразграждане се изчислява от газовете в парното пространство, като се използва уравнение [10], а общият процент на биоразграждане — като се използва уравнение [11]:

$$D_h = (m_h / m_v) \times 100 \quad \text{Уравнение [10]}$$

$$D_t = (m_t / m_v) \times 100 \quad \text{Уравнение [11]}$$

където:

D_h = биоразграждане от газовете в парното пространство (%);

D_t = общо биоразграждане (%);

m_h , m_v и m_t са както са определени по-горе.

Степента на първичното биоразграждане се изчислява от измерванията (по избор) на концентрацията на изпитваното вещество в началото и в края на инкубацията, с използване на уравнение [12]:

$$D_p = (1 - S_e / S_i) \times 100 \quad \text{Уравнение [12]}$$

където:

D_p = първично биоразграждане на изпитваното вещество (%);

S_i = крайна концентрация на изпитваното вещество (mg/l);

S_e = концентрация на изпитваното вещество в края (mg/l).

Ако методът за анализ показва значими концентрации на изпитваното вещество в неизменения инокулум с анаеробна утайка, се използва уравнение [13]:

▼ **M6**

$$D_p^1 = [1 - (S_e - S_{eb}) / (S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Уравнение [13]}$$

където:

D_p^1 = коригирано първично биоразграждане на изпитваното вещество (%);

S_{ib} = първоначална „привидна“ концентрация на изпитваното вещество в празни контроли (mg/l);

S_{eb} = „привидна“ концентрация на изпитваното вещество в празни контроли в края (mg/l).

Валидност на резултатите

50. Показанията за налягането следва да се използват само от съдове, които не показват розово оцветяване (вж. точка 33). Замърсяването с кислород се свежда до минимум чрез използване на подходящи техники за обработка в анаеробни условия.
51. Следва да се има предвид, че тестът е валиден, ако референтното вещество достигне плато, което представлява повече от 60 % биоразграждане ⁽¹⁾.
52. Ако рН в края на изпитването е превишила обхвата 7 ± 1 и протеклото биоразграждане е било недостатъчно, изпитването се повтаря с увеличен буферен капацитет на средата.

Потискане на разграждането

53. Получаването на газове в съдове, съдържащи изпитваното вещество и референтно вещество, трябва да бъде най-малко равно на това в съдовете, съдържащи само референтно вещество; в противен случай има показания за потискане на получаването на газове. В някои случаи получаването на газове в съдове, съдържащи изпитваното вещество, но без референтно вещество, ще бъде по-ниско, отколкото това в празните контроли, което сочи, че изпитваното вещество има потискащо въздействие.

Протокол от изпитването

54. Докладът от изпитването трябва да съдържа следната информация:

Изпитвано вещество:

- общоприето наименование, химично наименование, номер по CAS, структурна формула и съответни физични и химични свойства,
- чистота (онечиствания) на изпитваното вещество,

Условия на изпитването:

- обеми на разредената течност от реактора (V_l) и на парното пространство (V_h) в съда;
- описание на съдовете за изпитване, основните характеристики на измерването на биогаза (например вида манометър) и на анализатора на неорганичен въглерод;
- прилагане на изпитваното и референтното вещество в системата за изпитване: използвана концентрация на изпитване и използване на разтворители;
- подробни данни за използвания инокулум: име на пречиствателната станция за отпадъчни води, описание на източника на пречистените отпадъчни води (напр. работна температура, време на задържане на утайката, предимно битови и др.), концентрация, цялата необходима информация за обосновка на посоченото, и информация за всяко предварително третиране на инокулума (например преди разграждането, преди експозицията);
- температура на инкубиране,
- брой на повторенията.

⁽¹⁾ Това следва да се преразгледа, ако са включени адсорбиращи се или неразтворими референтни химикали.

▼ **M6***Резултати:*

- стойностите на рН и неорганичния въглерод в края на изпитването;
- концентрация на изпитваното вещество в началото и в края на изпитването, ако е извършено специфично измерване;
- всички измерени данни, събрани по време на изпитването, съдове с празна проба, референтно вещество и контроли за потискане, където е подходящо (напр. налягане в mbar, концентрация на неорганичен въглерод в mg/l) в таблична форма (данните от измервания за парното пространство и за течността следва да се протоколират отделно);
- статистическа обработка на данни, продължителност на изпитването и диаграма на биоразграждането на изпитваното вещество, референтното вещество и контролата за потискане;
- процент на биоразграждане на изпитваното вещество и на референтно вещество;
- причини за всякакво отхвърляне на резултати от изпитването;
- обсъждане на резултатите.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Следните части от настоящото приложение:
 - C.4, Determination of Ready Biodegradability;
 - C.9, Biodegradation — Zahn-Wellens Test;
 - C.10, Simulation Test — Aerobic Sewage Treatment:
 - A: Activated Sludge Units, B: Biofilms
 - C.11, Biodegradation — Activated sludge respiration inhibition
- (2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris
- (3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1527-1550. (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988).
- (4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microbiology*, 47, 850-857.
- (5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.* 13, 485-492.
- (6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 84-89.
- (7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.
- (8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. *Chemosphere*, 17, 2441-2460.
- (9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.

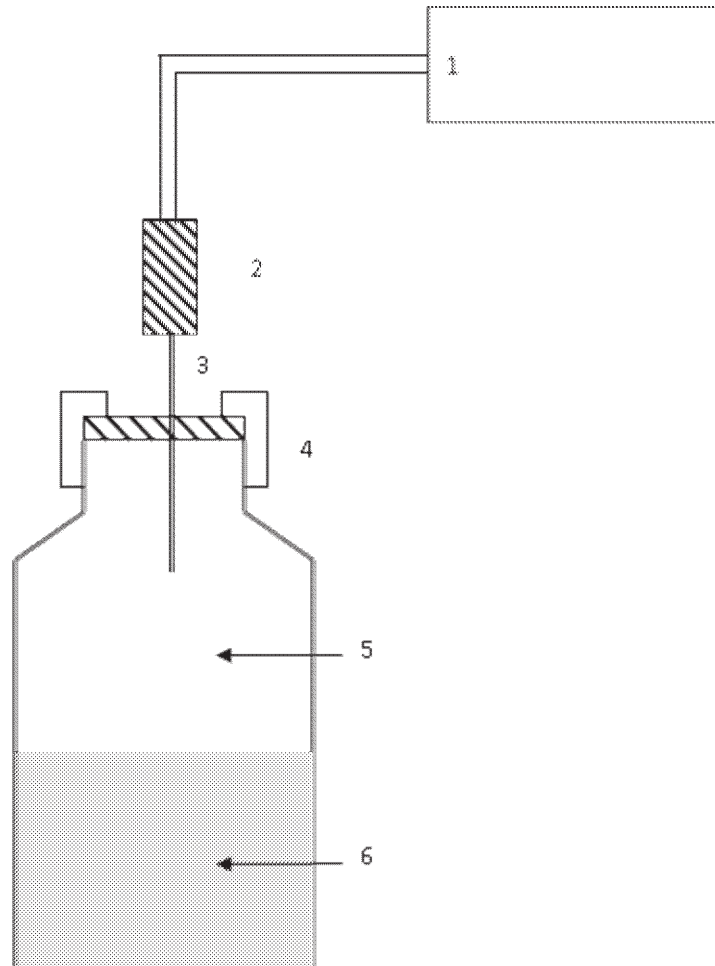
▼ M6

- (10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.
- (11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality — Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge — Method by measurement of the biogas production.
- (12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1 General Test.
- (13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
- (14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. *Chemosphere*, 27, 1499-1509.
- (15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼ M6

Допълнение 1

Пример за апаратура за измерване на получения биогаз чрез налягане на газовете



Легенда:

1 — Манометър

2 — 3-пътен газонепроницаем клапан

3 — игла от спринцовка

4 — газонепроницаема капсулирана запушалка (капачка за капсулиране и септа)

5 — парно пространство (V_h)

6 — инокулум с разградена утайка (V_l)

Съдове за изпитване в среда от $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

▼ **M6***Допълнение 2***Преобразуване на показанията на манометъра**

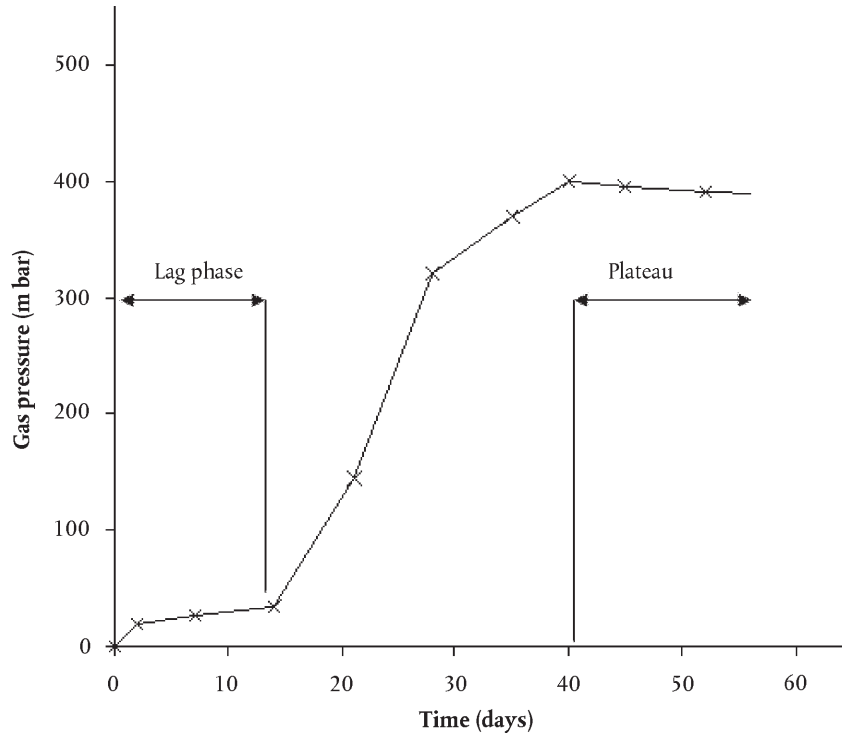
Показанията на манометъра могат да бъдат свързани с обемите на газовете чрез стандартна крива, получена чрез инжектиране на известни количества въздух при температура $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ в серумни бутилки, съдържащи обем вода, равен на този на реакционната смес, V_R :

- Аликвотни части от V_R ml вода, съхранявана при температура $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, се поставят в пет серумни бутилки. Бутилките се затварят херметически и се поставят на водна баня при температура 35 °C за 1 час за достигане на равновесие;
- Включва се манометърът, оставя се да се стабилизира и се коригира до нула;
- Иглата от спринцовка се вкарва през капсулираната запушалка на една от бутилките, клапанът се отваря до отчитане на стойност нула от манометъра и след това се затваря;
- Процедурата се повтаря с останалите бутилки;
- Във всяка бутилка се инжектира 1 ml въздух при $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Иглата (върху манометъра) се вкарва през капсулираната запушалка на една от бутилките и се дава възможност за стабилизиране на показанията. Показанията за налягането се записват, клапанът се отваря до отчитане на стойност нула от манометъра и след това се затваря;
- Процедурата се повтаря с останалите бутилки;
- Цялата горепосочена процедура се повтаря, като се използват 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml и 50 ml въздух;
- Начертава се крива на преобразуване на налягането (Pa) спрямо инжектирания обем газ V_b (ml). Откликът на инструмента е линеен в интервала от 0 Pa до 70 000 Pa, и от 0 ml до 50 ml получен газ.

▼ M6

Допълнение 3

Пример за крива на разграждане (кумулятивното нетно увеличение на налягането)



Пример за таблици с данни за изпитването за анаеробно биоразграждане — Таблица с данни за изпитваното вещество

Лаборатория: Изпитвано вещество: Изпитване №:
 Температура на изпитването (°C): Обем на парното пространство (V_h):(l) Обем на течността (V_l):(l)
 Въглерод в изпитваното вещество $C_{C,v}$:(mg/l) m_v ⁽¹⁾:(mg)

Ден	p_1 (изпитване) (mbar)	p_2 (изпитване) (mbar)	p_3 (изпитване) (mbar)	p (изпитване) средно (mbar)	p_4 (изпитване) (mbar)	p_5 (изпитване) (mbar)	p_6 (изпитване) (mbar)	p (празна проба) средно (mbar)	p (нето) изпитване — празна проба средно (mbar)	Δp (нето) Кумулативно (mbar)	m_h Въглерод в парното пространство ⁽²⁾ (mg)	D_h Биоразграждане ⁽³⁾ (%)
	$C_{IC, 1}$ изпитване (mg)	$C_{IC, 2}$ изпитване (mg)	$C_{IC, 3}$ изпитване (mg)	C_{IC} средна от изпитване (mg)	$C_{IC, 4}$ празна проба (mg)	$C_{IC, 5}$ празна проба (mg)	$C_{IC, 6}$ празна проба (mg)	C_{IC} средна празната проба (mg)	$C_{IC, net}$ изпитване — празна проба средно (mg)	m_l въглерод в течността ⁽⁴⁾ (mg)	m_t Общ въглерод ⁽⁵⁾ (mg)	D_t Биоразграждане ⁽⁶⁾ (%)
Неорганичен въглерод (IC) (край)												
pH (край)												

(1) Въглерод в съда за изпитване, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
 (2) Въглерод в парното пространство, m_h (mg) при нормална температура на инкубиране (35 °C): $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$
 (3) Биоразграждане, изчислено от газовете в парното пространство, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$
 (4) Въглерод в течността, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
 (5) Общ въглерод в газове, m_t (mg): $m_t = m_h + m_l$
 (6) Общо биоразграждане, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

▼ **M6**

Лаборатория: Референтно в: Изпитване №:
 Температура на изпитването (°C): Обем на парното пространство (V_h):(l) Обем на течността (V_l) (литри):
 Въглерод в референтното вещество $C_{c,v}$ (mg/l): m_v (¹) (mg):

Ден	p_1 (реф.) (mbar)	p_2 (реф.) (mbar)	p_3 (реф.) (mbar)	p (реф.) средно (mbar)	p_4 (потиск.) (mbar)	p_5 (потиск.) (mbar)	p_6 (потиск.) (mbar)	p (потиск.) средно (mbar)	p (реф.) реф. — празна проба (mbar)	Δp (ref.) натрупване (mbar)	m_h Въглерод в парното простран- ство (²) (mg)	D_h Биоразграж- дане (³) (%)
	$C_{IC, 1}$ реф. (mg)	$C_{IC, 2}$ реф. (mg)	$C_{IC, 3}$ реф. (mg)	C_{IC} средна реф. (mg)	$C_{IC, 4}$ потиск. (mg)	$C_{IC, 5}$ потиск. (mg)	$C_{IC, 6}$ потиск. (mg)	C_{IC} средна потиск. (mg)	$C_{IC, net}$ реф. потиск. (mg)	— m_l въглерод в течността (⁴) (mg)	m_t Общ въгле- род (⁵) (mg)	D_t Биоразграж- дане (⁶) (%)
Неор- ганичен въглерод (IC) (край)												
pH (край)												

(¹) Въглерод в съда за изпитване, m_v (mg): $m_v = C_{c,v} \times V_l$
 (²) Въглерод в парното пространство, m_h (mg) при нормална температура на инкубиране (35 °C): $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$
 (³) Биоразграждане, изчислено от газовете в парното пространство, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$
 (⁴) Въглерод в течността, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
 (⁵) Общ въглерод в газове, m_t (mg): $m_t = m_h + m_l$
 (⁶) Общо биоразграждане, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

▼ M6

B.44. ПРОСМУКВАНЕ В ПОЧВЕНИ КОЛОНИ

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 312 (2004). Синтетични химикали могат да достигнат до почвата пряко чрез преднамерено използване (напр. агрохимикали) или чрез непреки пътища (напр. чрез отпадъчни води → утайки от отпадъчни води → почва или въздух → мокри/сухи утайки). За оценката на риска по отношение на тези химикали е важно да се прецени техният потенциал за трансформация в почвата и за движение (просмукване) към по-дълбоки почвени слоеве и евентуално в подпочвени води.
2. Съществуват няколко метода за измерване на потенциала за просмукване на химикалите в почвата в контролирани лабораторни условия, т.е. тънкослойна хроматография с почва, хроматография с дебел слой почва, колонна хроматография с почва и измервания на адсорбция — десорбция (1) (2). За нейонизираните химикали, коефициентът на разпределение n-октанол-вода (P_{ow}) позволява ранна оценка на тяхната адсорбция и потенциала им за просмукване в почвата (3) (4) (5).
3. Методът, описан в настоящия метод за изпитване, е основан на колонна хроматография с почва, за обработени почви (вж. допълнение 1 за определение). Два вида опити се провеждат, за да се определи (i) потенциалът за просмукване на изпитвания химикал, и (ii) на потенциалът за просмукване на продуктите от трансформацията (проучване със стари остатъци) в почвите при контролирани лабораторни условия⁽¹⁾. Методът за изпитване се основава на съществуващи методи (6)(7)(8)(9)(10)(11).
4. Семинарът на ОИСП за избор на почви/седименти, проведен в Belgirate, Италия, през 1995 г. (12), приема броя и вида на почвите, използвани при този метод за изпитване. На него също така са направени препоръки по отношение на вземането, обработването и съхранението на почвени проби за опити за просмукване.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

5. Колони, направени от подходящ инертен материал (например стъкло, неръждаема стомана, алуминий, тефлон, PVC и др.) се пълнят с почва, и след това се насищат и уравновесяват с разтвор „изкуствен дъжд“ (за определение вж. допълнение 1) и се оставят да се отцеждат. След това повърхността на всяка колона с почва се третира с изпитвания химикал и/или със стари остатъци от изпитвания химикал. След това се прилага изкуствен дъжд към почвените колони и отцедената вода се събира. След процеса на просмукване почвата се отстранява от колоните и се разделя на подходящ брой сегменти в зависимост от информацията, която се изисква от проучването. Всеки сегмент на почвата и отцедената вода се анализират за изпитвания химикал и, ако е подходящо, за продукти от трансформацията или други химикали, представляващи интерес.

ПРИЛОЖИМОСТ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

6. Този метод на изпитване е приложим по отношение на изпитвани химикали (небелязани или изотопно белязани: напр. ^{14}C), за които има метод за анализ с достатъчна точност и чувствителност. Методът за изпитване не трябва да се прилага при химикали, които са летливи при прилагане върху почвата и водата и по този начин не остават в почвата и/или отцедената вода при условията на изпитване на настоящия метод за изпитване.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАННИЯ ХИМИКАЛ

7. За измерване на просмукването в почвените колони могат да бъдат използвани небелязани или изотопно белязани изпитвани химикали. Изотопно белязаният материал се изисква за изучаване на просмукването на продуктите от трансформацията (стари остатъци от

⁽¹⁾ Изследванията за просмукване в колони с продукти за растителна защита могат да предоставят информация за мобилността на даден изпитван химикал и продуктите от трансформацията му, и могат да допълват серийни изследвания на сорбцията.

▼ M6

изпитвания химикал) и за определяне на масовия баланс. Белязване с ^{13}C се препоръчва, но могат да бъдат полезни и други изотопи, като ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P . Доколкото е възможно, белязването трябва да стане в най-стабилната(ите) част(и) на молекулата. Изпитваният химикал трябва да бъде със степен на чистота минимум 95 %.

8. Повечето химикали следва да се прилагат като единствено вещество. Обаче за активни вещества в продукти за растителна защита могат да се използват формулирани продукти за изследване на просмукването на базовото изпитвано вещество, но тяхното изпитване се изисква особено в случаите, когато е вероятно сместа да окаже влияние върху скоростта на освобождаване (напр. при гранулираните формулировки, или при формулировките с контролирано освобождаване). По отношение на специфичните за сместа изисквания за планирането на изпитването, може да се окаже полезно консултиране с регулаторния орган преди провеждането на изпитването. При изследванията за просмукване на стари остатъци следва да се използва чистото базово изпитвано вещество.

9. Преди провеждане на изпитване за просмукване в почвени колони за предпочитане е да бъде налична следната информация за изпитвания химикал:

- (1) разтворимост във вода [метод за изпитване A.6] (13);
- (2) разтворимост в органични разтворители;
- (3) парно налягане [метод за изпитване A.24] (13) и константата от закона на Хенри;
- (4) коефициент на разпределение n-октанол/вода [методи за изпитване A.8 и A.24] (13);
- (5) коефициент на адсорбция (K_d , K_f или K_{OC}) [методи за изпитване B.18 и/или B.19] (13);
- (6) хидролиза (метод за изпитване B.7] (13);
- (7) константа на дисоциация (pK_a) [Насоки на ОИСП 112] (25);
- (8) аеробна и анаеробна трансформация в почва [метод за изпитване B. 23] (13)

Забележка: В съответните протоколи от изпитвания трябва да бъде протоколирана температурата, при която са направени тези измервания.

10. Количеството от изпитвания химикал, приложено към почвените колони, следва да бъде достатъчно, за да позволи откриването на най-малко 0,5 % от приложената доза във всеки отделен сегмент. За активни химикали в продукти за растителна защита, приложеното количество от изпитвания химикал може да съответства на максималната препоръчителна доза (еднократно прилагане).

11. Трябва да бъде на разположение подходящ метод за анализ с известни точност, прецизност и чувствителност при количественото определяне на изпитвания химикал и, когато това е приложимо, на неговите продукти от трансформацията в почвата и отцедената вода. Границата на аналитично откриване на изпитвания химикал и неговите значими продукти на трансформация (обикновено поне всички продукти от трансформацията $\geq 10\%$ от приложената доза, наблюдавани при проучванията за пътищата на трансформация, но за предпочитане всички относими продукти от трансформацията, представляващи интерес) трябва също да са известни (вж. точка 17).

▼ M6**РЕФЕРЕНТНИ ХИМИКАЛИ**

12. За оценка на относителната мобилност на изпитвания химикал в почвата следва да се използват референтни химикали с известно поведение при просмукване, като атразин или монурон, които могат да бъдат считани за умерено просмукващи се в полски условия (1) (8) (11). Несорбиращ се и неразградим полярен референтен химикал (напр. тритиев бромид, флуоресцеин, еозин) за проследяване на движението на водата в колоната може също да бъде полезен с оглед потвърждаване на хидродинамичните свойства на почвената колона.
13. Еталонни аналитични химикали също могат да бъдат полезни за охарактеризиране и/или идентифициране на продуктите от трансформацията, открити в почвените сегменти и в отцедената вода чрез хроматографски, спектроскопски, или други относими методи.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

14. Виж допълнение 1.

КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО**Аналитичен добив**

15. Сборът от процентите от изпитвания химикал, открити в почвените сегменти и в отцедената вода след просмукването, дава аналитичния добив за даден опит с просмукване. Аналитичните добиви трябва да бъдат в обхвата от 90 % до 110 % за изотопно белязани химикали (11) и от 70 % до 110 % за небелязани химикали (8).

Повторяемост и чувствителност на метода за анализ

16. Повторяемостта на метода за анализ за количествено определяне на изпитвания химикал и продуктите от трансформацията може да бъде проверена чрез анализ на двукратни повторения от един и същ екстракт от почвен сегмент или от отцедената вода (вж. точка 11).
17. Границата на откриване (LOD) на метода за анализ по отношение на изпитвания химикал и на продуктите от трансформацията му трябва да бъде поне $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ във всеки почвен сегмент или в отцедената вода (като изпитван химикал), или 0,5 % от приложената доза във всеки отделен сегмент, като се взема по-ниската стойност. Трябва да бъде определена също и границата за количествено определяне на метода (LOQ).

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ИЗПИТВАНЕ**Система за изпитване**

18. За изпитването се използват колони за просмукване (сегментирани или не), направени от подходящ инертен материал (например стъкло, неръждаема стомана, алуминий, тефлон, PVC и др.) с вътрешен диаметър от поне 4 cm и минимална височина от 35 cm. Материалите за колоните следва да бъдат изпитани за потенциално взаимодействие с изпитвания химикал и/или продуктите от трансформацията му. Примери за подходящи сегментирани и несегментирани колони са дадени в допълнение 2.
19. За пълнене и запълване на почвените колони се използват лъжица, бутало и апарат за вибрации.
20. За прилагането на изкуствен дъжд към почвените колони могат да се използват бутални или перисталтични помпи, глави за душ, устройства за подаване на постоянен поток течност или обикновени делителни фунии.

▼ **M6****Лабораторно оборудване и химикали**

21. Необходимо е стандартно лабораторно оборудване, по-специално следното:
- (1) инструменти за анализ, като оборудване за газо-течна, високоефективна течна и тънкослойна хроматография, включително подходящи детектори за анализиране на изотопно белязани и небелязани химикали или метод с обратно изотопно разреждане;
 - (2) инструменти, използвани за целите на идентификацията (напр. маспектрометър, газова хроматография с маспектрометър, високоефективна течна хроматография с маспектрометър, ЯМР и др.);
 - (3) течен сцинтилационен брояч за изотопно белязани изпитвани химикали;
 - (4) апарат за окисление, за изгаряне на белязани материали;
 - (5) апаратура за екстракция (например центрофужни епруветки за студена екстракция и апарат „Сокслет“ за продължителна екстракция с хладник);
 - (6) оборудване за концентриране на разтвори и екстракти (напр. ротационен изпарител).
22. Използваните химикали включват: органични разтворители с квалификация „чист“, като ацетон, метанол и др.; сцинтилационна течност; Разтвор 0,01 M CaCl₂ в дестилирана или дейонизирана вода (= изкуствен дъжд).

Изпитван химикал

23. За прилагане на изпитвания химикал в почвената колона той следва да бъде разтворен във вода (дейонизирана или дестилирана). Ако изпитваният химикал е малко разтворим във вода, той може да бъде приложен или като формулиран продукт (ако е необходимо, след суспендиране или емулгиране във вода) или във всякакъв органичен разтворител. В случай че се използва органичен разтворител, той следва да бъде сведен до минимум и следва да се изпари от повърхността на почвената колона преди да започне процедурата по просмукването. Твърдите формулировки, като например гранули, следва да се прилагат в твърда форма без вода; за да се даде възможност за по-добро разпределение по повърхността на почвената колона, формулираният продукт може да бъде смесен с малко количество кварцов пясък (напр. 1 g) преди прилагането.
24. Количеството от изпитвания химикал, приложено към почвените колони, следва да бъде достатъчно, за да позволи откриването на най-малко 0,5 % от приложената доза във всеки отделен сегмент. За активни химикали в продукти за растителна защита, това може да се основава на максималната препоръчителна доза (еднократно прилагане) и, за просмукване както на стари остатъчни, така и на базови вещества, следва да бъде свързано с площта на почвената колона, която се използва ⁽¹⁾.

Референтен химикал

25. При опитите за просмукване следва да се използва референтен химикал (вж. точка 12). Той следва да се прилага към повърхността на почвата в колоната по начин, подобен на този за изпитвания химикал, и в подходящо количество, което да дава възможност за

⁽¹⁾ Количеството, което следва да се прилага към цилиндрични почвени колони, може да се изчисли с помощта на следната формула:

$$M [\mu\text{g}] = \frac{A [\text{kg}/\text{ha}] \cdot 10^9 [\mu\text{g}/\text{kg}] \cdot d^2 [\text{cm}^2] \cdot \pi}{10^8 [\text{cm}^2/\text{ha}] \cdot 4}$$

където:

M = приложено количество на колона [μg]

A = прилагано количество на площ [$\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$]

d = диаметър на почвената колона [cm]

π = 3,14

▼ **M6**

достатъчно откриване или като вътрешен стандарт, заедно с изпитвания химикал в същата почвена колона, или самостоятелно в отделна почвена колона. Предпочита се изпитването и с двата химикала да се провежда в същата колона, с изключение на случаите, когато тези два химикала са белязани по подобен начин.

Почви*Избор на почва*

26. При изследванията за просмукване с базовия изпитван химикал следва да се използват 3-4 почви с различни стойности на рН, съдържание на органичен въглерод и зърнометричен състав (12). Насоки за избор на почви при опити с просмукване са дадени в таблица 1 по-долу. За изпитвани химикали, които могат да се йонизират, избраните почви следва да покриват широк интервал от рН, с цел да се оцени мобилността на химикала в неговите йонизирана и нейонизирана форми; най-малко 3 почви трябва да имат рН, при което изпитваният химикал е в мобилната си форма.

Таблица 1

Насоки за избор на почви при изследвания за просмукване

№ на почвата	Стойност на рН	Органичен въглерод %	Съдържание на глина %	Зърнометричен състав (*)
1	> 7,5	3,5 — 5,0	20 — 40	песъкливо-глинесто-праховита
2	5,5 — 7,0	1,5 — 3,0	15 — 25	песъкливо-праховита
3	4,0 — 5,5	3,0 — 4,0	15 — 30	глинесто-песъкливо-праховита
4	< 4,0 — 6,0 §	< 0,5 — 1,5 § ‡	< 10 — 15 §	песъклива (свързан пясък)
5	< 4,5	> 10 #	< 10	песъклива (свързан пясък)/песъклива (рохкав пясък)

(*) Според класификационните системи на ФАО и на министерството на земеделието на САЩ (14).

§ Съответните променливи следва да показват предимно стойности в дадения обхват. В случай обаче, че се появят трудности при намирането на подходящ почвен материал, приемат се стойности и под посочения минимум.

‡ Почви с наличие на по-малко от 0,3 % органичен въглерод могат да нарушат корелацията между органичното съдържание и адсорбцията. Следователно се препоръчва използването на почви с минимално съдържание на органичен въглерод от 0,3 %.

Възможно е почвите с много високо съдържание на въглерод (напр. > 10 %) да не са приемливи от правна гледна точка, например за целите на регистрацията на пестициди.

27. Понякога може да се наложи използване на други видове почви, които да са представителни за по-студени, умерени и тропически зони. Следователно, ако се предпочитат други видове почви, те следва да бъдат характеризирани със същите параметри и следва да имат подобни вариации в свойствата, като описаните в Насоките за избор на почви при изследвания за просмукване (вж. таблица 1 по-горе), дори и да не съответстват точно на критериите.
28. При изследвания за просмукване със „стари остатъци“ следва да бъде използван един тип почва (12). Той трябва да има съдържание на пясък > 70 % и съдържание на органичен въглерод между 0,5-1,5 % (например почва № 4 в таблица 1). Използването на повече видове почви може да бъде необходимо, ако данните за продуктите от трансформацията са важни.
29. Всички почви трябва да бъдат охарактеризирани, поне по отношение на зърнометричния им състав [% песъклива, % праховита, % глинеста фракция съгласно класификационните системи на ФАО и на министерството на земеделието на САЩ (14)], рН, катионообменен капацитет, съдържание на органичен въглерод, обемно тегло (за обработени почви)

▼ **M6**

и способност за задържане на вода. Измерването на микробната биомаса се изисква само за почвата, която се използва през периода на стареене/инкубация, който е преди опита с просмукване на стари остатъчни количества. Информацията относно допълнителни свойства на почвата (например класификация на почвите, минералогия на глината, специфична повърхност) може да бъде полезна за интерпретирането на резултатите от настоящото проучване. За определянето на характеристиките на почвата могат да бъдат използвани методите, препоръчани в позовавания (15) (16) (17) (18) (19).

Вземане и съхранение на почвени проби

30. Почвените проби трябва да бъдат вземани от горния слой (хоризонт А) най-много до дълбочина 20 cm. Остатъците от растителност, макрофауна и камъни трябва да бъдат отстранени. Почвите (с изключение на използваните за стареене на изпитвания химикал) се изсушават на въздух при стайна температура (за предпочитане между 20-25 °C). Разрушаването на агрегатите следва да се извършва с минимална сила, така че оригиналната структура на почвата да се измени колкото е възможно по-малко. Почвите се пресяват през сито ≤ 2 mm. Препоръчва се внимателно хомогенизиране, тъй като това повишава възпроизводимостта на резултатите. Преди използване почвите могат да се съхраняват при температура на околната среда и да се държат изсушени на въздух (12). Не се препоръчва ограничаване на времето за съхраняване, но почви, които се съхраняват повече от 3 години, се анализират отново преди употребата с оглед на тяхното съдържание на органичен въглерод и рН.
31. Трябва да има подробна информация за историята на мястото в полето, откъдето са били взети почвените проби за изпитване. Подробности включват точно местоположение [точно определено чрез UTM (Универсална напречна цилиндрична проекция на Меркатор /Европейска хоризонтална координатна система (European Horizontal Datum) или географски координати], растителна покривка, обработване с химикали за растителна защита, третиране с органични и неорганични торове, прибавяне на биологични материали или случайни замърсявания (12). Ако почва е третирана с изпитвания химикал или с негови структурни аналози през предходните четири години, тя не трябва да бъде използвана за изследвания за просмукване.

Условия на изпитването

32. По време на периода за провеждане на изпитването почвените колонии за изпитване на просмукването следва да се съхраняват на тъмно при стайна температура, при условие, че тази температура се поддържа в границите на ± 2 °C. Препоръчват се температури между 18 и 25 °C.
33. Към повърхността на почвената колона следва непрекъснато да се прилага изкуствен дъжд (0,01 M CaCl₂) в количества от 200 mm за период от 48 часа⁽¹⁾; Тези прилагани количества са равностойни на прилагане на 251 ml за колона с вътрешен диаметър от 4 cm. Ако е необходимо за целите на изпитването, могат допълнително да бъдат използвани други прилагани количества изкуствен дъжд и по-голяма продължителност.

Провеждане на изпитването

Просмукване с базов изпитван химикал

34. Колонии за изпитване на просмукването в най-малко две повторения се запълват с нетретирана, изсушена на въздух и пресятата почва (сито < 2 mm) до височина приблизително 30 cm. За получаване на еднотипен пълнеж почвата се добавя към колоните на малки порции с лъжица и се притиска с бутало, като едновременно с това колоната се подлага на леки вибрации, докато горната част на почвата в колоната престане да

⁽¹⁾ Това симулира изключително високи стойности на валежите. Например средногодишната стойност на валежите в Централна Европа е от порядъка на 800-1 000 mm.

▼ **M6**

потъва допълнително. Еднообразното запълване се изисква с оглед получаването на възпроизводими резултати от колоните за изпитване на просмукването. За подробни данни относно техниките за запълване на колоните вж. (20), (21) и (22). За контролиране на възпроизводимостта на процедурата по запълване се определя общото тегло на почвата, напълнена в колоните⁽¹⁾; теглата на двете повторения на колони следва да са сходни.

35. След запълването се извършва предварително омокряне на колоните с почва с изкуствен дъжд (0,01 M CaCl₂), от основата към върха, с цел въздухът в порите на почвата да се замести с вода. След това се дава възможност за достигане на равновесие в почвените колони и излишната вода се оттежда гравитационно. Преглед на методи за насищане на колоната е направен в позоваване (23).
36. След това изпитваният и/или референтният химикал се прилагат към почвените колони (виж също точки 23-25). За получаване на хомогенно разпределение разтворите, суспензиите или емулсиите на изпитвания и/или референтния химикал следва да се прилагат равномерно над повърхността на почвените колони. Ако по отношение на прилагането на изпитван химикал се препоръчва внасяне в почвата, той следва да се смеси в малко количество (например 20 g) почва и да се добави към повърхността на почвата в колоната.
37. След това повърхността на почвените колони се покрива с диск от синтеровано стъкло, стъклени перли, филтри от стъклено влакно или кръгла филтърна хартия, за разпределяне на изкуствения дъжд равномерно по цялата повърхност и за избягване нарушаването на повърхността на почвата от дъждовните капки. Колкото е по-голям диаметърът на колоната, толкова повече грижи са необходими за гарантиране на равномерно разпределение на изкуствения дъжд над повърхността на почвата при прилагането на изкуствен дъжд към почвените колони. След това изкуственият дъжд се добавя на капки към почвените колони с помощта на бутало или перисталтична помпа, или делителна фуния. За предпочитане е отцедената вода да се събира на фракции и техните съответни обеми да се записват⁽²⁾.
38. След просмукването и оставянето на водата в колоните да се оттече, почвените колони се сегментират на подходящ брой сегменти в зависимост от информацията, която се изисква от проучването, сегментите се екстрахират с подходящи разтворители или смеси от разтворители и се анализират за изпитвания химикал и, където е подходящо, за продукти от трансформацията, за обща радиоактивност и за референтния химикал. Отцедената вода или фракции от нея се анализират или директно, или след екстракция, за същите продукти. Когато се използва изотопно белязан изпитван химикал, всички части, съдържащи $\geq 10\%$ от приложената радиоактивност, следва да бъдат идентифицирани.

Просмукване със стари остатъци

39. Прясната почва (която не е предварително изсушена на въздух) се третира със скорост, съответстваща на повърхността на почвените колони (вж. точка 24), с изотопно белязания изпитван химикал и се инкубира при аеробни условия съгласно метод за изпитване B.23 (13). Периодът на инкубация (стареене) трябва да бъде достатъчно дълъг, за да се получат значими количества продукти от трансформация;

⁽¹⁾ Примери за обемно тегло при обработени почви са, както следва: за пясъклива почва (рохкав пясък) $1,66 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$
за пясъклива почва (свързан пясък) $1,58 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$
за глинесто-пясъкливо-праховита почва $1,17 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$
за праховита почва $1,11 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$

⁽²⁾ Обичайните обеми на отцедената вода варират от 230-260 ml, съответстващо на около 92-104% от приложеното общо количество изкуствен дъжд (251 ml) при използване на почвени колони с диаметър 4 cm и дължина 30 cm.

▼ **M6**

препоръчва се период на стареене, равен на периода на полуразграждане на изпитвания химикал⁽¹⁾, но този период не следва да надхвърля 120 дни. Преди просмукването преминалата през стареене почва се анализира за изпитвания химикал и за продуктите от трансформацията му.

40. Колоните за изпитване на просмукването се пълнят до височина 28 cm със същата почва (но изсушена на въздух), която се използва при опита със стареенето, описан в точка 34, и също се определя общото тегло на запълнените почвени колони. След това се извършва предварително омокряне на колоните с почва, както е описано в точка 35.
41. След това изпитваният химикал и продуктите от трансформацията му се прилагат към повърхността на почвените колони под формата на стари остатъци в почвата (вж. точка 39) като почвен сегмент от 2 cm. Предпочита се общата височина на почвените колони (нетретирана почва + преминала през стареене почва) да не надхвърля 30 cm (вж. точка 34).
42. Просмукването се извършва така, както е описано в точка 37.
43. След просмукването почвените сегменти и отцедената вода се анализират така, както е посочено в точка 38, за изпитвания химикал, продуктите от трансформацията му и неизвлечената радиоактивност. За да се определи каква част от старите остатъци се е задържала в горния слой от 2 cm след просмукването, този сегмент следва да се анализира отделно.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Обработка на резултатите**

44. Количествата от изпитвания химикал, продуктите от трансформацията му, неекстрахируемите и, ако са включени, тази на референтния химикал, следва да бъдат изразени в процент от приложената първоначална доза за всеки почвен сегмент и фракция от отцедената вода. За всяка колона следва да се даде графично представяне, като установените проценти се начертаят като функция от дълбочините на почвата.
45. Когато в тези изследвания за просмукване в колони е включен референтен химикал, просмукването на даден химикал може да бъде оценено с относителна скала, като се използват коефициенти на относителна мобилност (КОМ; за определение вж. допълнение 3) (1) (11), което позволява сравняване на данни за просмукването на различни химикали, получени с различни видове почви. Примери за стойности на КОМ за различни химикали за растителна защита са дадени в допълнение 3.
46. Оценките на органичния въглерод K_{oc} (нормализиран коефициент на адсорбция на органичния въглерод) и K_{om} (нормализиран коефициент на разпределение на органичната материя) могат също да бъдат получени от резултатите от просмукването в колоните, като се използва средното разстояние на просмукване или установените корелации между КОМ и съответно K_{om} и K_{oc} (4), или чрез прилагане на обикновената хроматографска теория (24). Независимо от това, последният метод следва да се използва с предпазливост, особено като се има предвид, че процесът на просмукване включва не само отток в наситен режим, а по-скоро системи в ненаситен режим.

⁽¹⁾ В почвата могат да се образуват повече от един основни продукти от трансформацията, като тези продукти също могат да се появят в различни времеви моменти по време на проучването за трансформация. В такива случаи може да е необходимо да се извършат изследвания на просмукването със стари остатъци, образувани по различно време.

▼ **M6****Интерпретиране на резултатите**

47. Изследванията за просмукване в колони, описани в настоящия метод, позволяват определянето на потенциала на изпитвания химикал за просмукване или за мобилност в почвата (в проучването за просмукване на базисния химикал) и/или продуктите от трансформацията му (в проучването за просмукване на стари остатъци). Тези изпитвания не прогнозираат количествено поведението при просмукване в полеви условия, но те могат да се използват за съпоставяне на „способността за просмукване“ на даден химикал с други, чието поведение при просмукване може да бъде известно (24). По подобен начин, те не измерват количествено процента на приложения химикал, който може да достигне до подпочвените води (11). Независимо от това, резултатите от изследванията за просмукване в колони могат да помогнат при вземането на решение дали трябва да бъдат проведени допълнителни полуполеви или полеви изпитвания за химикали, които показват голям потенциал за мобилност в лабораторни изпитвания.

Протокол от изпитването

48. Протоколът трябва да съдържа:

Изпитван и референтен химикал (когато се използва такъв):

- общоприето наименование, химично наименование (номенклатури на IUPAC и на CAS), CAS номер, химична структура (показваща къде е белязан изотопно белязаният материал, когато се използва такъв) и относими физични и химични свойства;
- чистота (онечиствания) на изпитвания химикал;
- радиохимична чистота на белязания химикал и специфична активност (където е уместно).

Изпитвани почви:

- подробности за мястото, от което са събирани;
- свойства на почвите, такива като рН, съдържание на органичен въглерод и глинеста фракция, зърнометричен състав и обемно тегло (за обработени почви);
- почвена микробна активност (само за почвите, използвани за стареене на изпитвания химикал);
- продължителност на периода на съхраняване на почвата и условия на съхранение.

Условия на изпитването:

- дати на извършване на изследванията;
- дължина и диаметър на колоните за изпитване на просмукването;
- общо тегло на почвата в почвените колони;
- количество на приложения изпитван химикал и, ако е подходящо, на приложения референтен химикал;
- количество, честота и продължителност на прилагането на изкуствен дъжд;
- температура на опитната постановка;
- брой повторения (най-малко две);
- методи за анализ на изпитвания химикал, на продуктите от трансформацията и, където е приложимо, на референтния химикал в различните почвени сегменти и в отцедената вода;
- методи за характеризирание и идентифициране на продуктите от трансформацията в почвените сегменти и в отцедената вода.

▼ **M6***Резултати от изпитването:*

- таблици с резултати, изразени като концентрации и като процент от приложената доза за почвените сегменти и за отцедената вода;
- масов баланс, ако е приложимо;
- обеми на отцедената вода;
- разстояния на просмукване и, където е приложимо, коефициенти на относителна мобилност;
- графично изобразяване на процентите, установени в почвените сегменти, като функция от дълбочината на почвения сегмент;
- обсъждане и интерпретиране на резултатите.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.
- (2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals — T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.
- (3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.
- (4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.
- (5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.
- (6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (8) Annex I to Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market, OJ L 172, 22.7.1995, p. 8.
- (9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.
- (11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/ Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (13) Следните глави от настоящото приложение:

Глава А.4, парно налягане

Глава А.6, разтворимост във вода

▼ **M6**

Глава А.8, коефициент на разпределение, метод „разклащане в стък-
леница“

Глава А.24, коефициент на разпределение, метод BETX

Глава В.7, Разграждане — абиотично разграждане: хидролиза като
функция от рН

Глава В.18, Адсорбция/десорбция чрез използване метода за
равновесие в групата

Глава В.23, Аеробна и анаеробна трансформация в почва

- (14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26, 305 (1962).
- (15) *Methods of Soil Analysis* (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.
- (16) *Methods of Soil Analysis* (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.
- (17) ISO Standard Compendium Environment (1994). *Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis*. First Edition.
- (18) Mückenhausen, E. (1975). *Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen*. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.
- (19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). *Lehrbuch der Bodenkunde*. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977). In *Research Methods in Weed Science*, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.
- (21) Weber, J.B., Swain, L.R., Streck, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In *Research Methods in Weed Science*, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.
- (22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 60(1): 49-53.
- (23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. — A review. *J. Contam. Hydrol.* 7, 177-217.
- (24) Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In *Environmental Dynamics of Pesticides* (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.
- (25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris

▼ **M6***Допълнение 1***Определения и мерни единици**

Стари остатъци в почвата: Изпитваният химикал и продуктите от трансформацията, налични в почвата след прилагането и след период, който е достатъчно продължителен за протичането на процесите по придвижването, адсорбцията, метаболизма и разсейването, за изменение на разпределението и химичната природа на част от приложения химикал (1).

Изкуствен дъжд: Разтвор 0,01 M CaCl₂ в дестилирана или дейонизирана вода.

Средно разстояние на просмукване: Долната част на почвения сегмент, където кумулативната стойност на аналитичния добив от химикала = 50 % от общата стойност на аналитичния добив от изпитвания химикал [обичаен опит по просмукване], или; (долната част на почвения сегмент, където кумулативната стойност на аналитичния добив от химикала = 50 % от общата стойност на аналитичния добив от изпитвания химикал) — ((дебелина на слоя от стари остатъци)/2) [проучване за просмукване на стари остатъци]

Химикал: Вещество или смес.

Отцедена вода: Водна фаза, процедила се през почвен профил, или през почвена колона (1).

Просмукване: Процес, при който даден химикал се движи надолу през почвения профил, или през почвена колона (1).

Разстояние на просмукване: Най-дълбокият почвен сегмент, в който след процеса на просмукване е бил установен $\geq 0,5$ % от приложения изпитван химикал или стари остатъци (равностойно на дълбочина на проникване).

Граница на откриване (LOD) и граница на количествено определяне (LOQ): Границата на откриване (LOD) представлява концентрацията на даден химикал, под която идентичността на химикала не може да бъде разграничена от аналитичните артефакти. Границата на количествено определяне (LOQ) представлява концентрацията на даден химикал, под която концентрацията не може да бъде установена с приемлива точност.

КОМ коефициент на относителна мобилност: (разстояние на просмукване на изпитвания химикал (cm))/(разстояние на просмукване на референтния химикал (cm))

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

Продукт от трансформацията: Всички химикали, получени в резултат на реакции по биотична и абиотична трансформация на изпитвания химикал, включително CO₂ и продуктите, които са свързани в остатъци.

Почва: Смес от неорганични и органични химични компоненти, последните от които съдържат съединения с високо съдържание на въглерод и азот и с високи молекулни тегла, обитавана от малки организми (предимно микроорганизми). Почвата може да бъде третирана в две състояния:

- необработено, в каквото се е развивала с времето, в характерни пластове на различни типове почви;
- обработено, в каквото тя се намира обикновено в обработваеми площи или когато пробите са взети чрез разкопаване и се използват в настоящия метод за изпитване (2).

(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

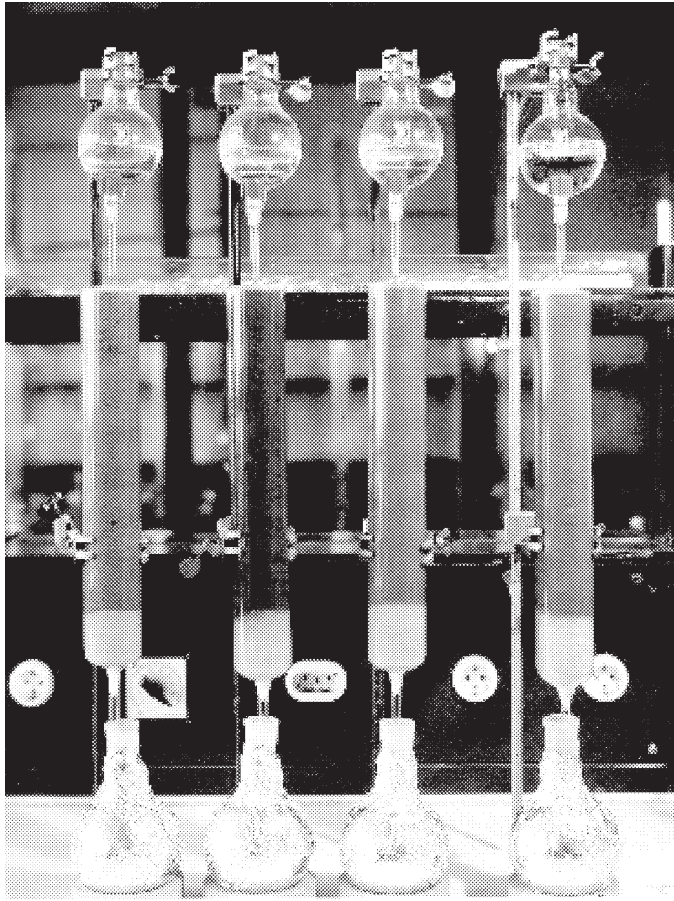
(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

▼ M6

Допълнение 2

Фигура 1

Пример за несегментируеми колони за изпитване на просмукването, изработени от стъкло с дължина 35 cm и вътрешен диаметър 5 cm (1)



← Делителни фунии за прилагане на изкуствен дъжд

← Диск от синтеровано стъкло за избягване на нарушаването на повърхността на почвата и за разпределяне на изкуствения дъжд равномерно по цялата повърхност

← Стъклена колона с пълнеж почва за изпитване (при изпитване на неустойчиви на светлина продукти колоните трябва да бъдат обвити в алуминиево фолио)

← Слой от кварцов пясък

← Запушалка от стъклена вата за задържане на почвата в колоната

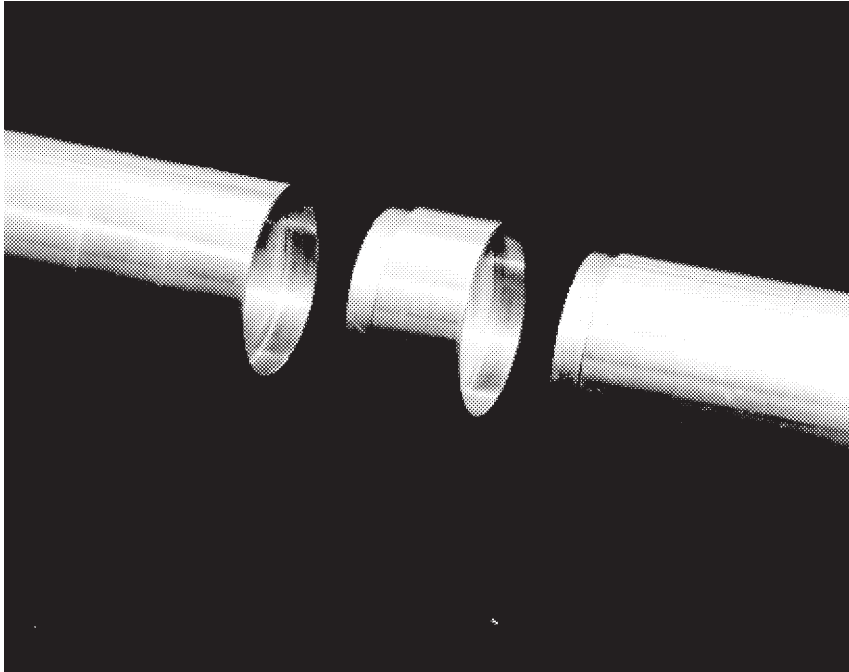
← Облодънна колба за събиране на отцедена вода; обвита в алуминиево фолио, за недопускане на фотолитиза

(1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden — 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

▼ M6

Фигура 2

Пример за сегментируема метална колона с вътрешен диаметър 4 cm (1)



- (1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

▼ **M6**

Допълнение 3

Примери за коефициенти на относителна мобилност (*) (КОМ) за различни химикали за растителна защита (1)(2) и съответните класове на мобилност (+)

КОМ-обхват	Химикал (КОМ)	Клас на мобилност
≤ 0,15	Паратион (< 0,15), Флуродифен (0,15)	I неподвижен
0,15 — 0,8	Профенофос (0,18), Пропиконазол (0,23), Диазинон (0,28), Диурон (0,38), Тербутилазин (0,52), Метидатион (0,56), Прометрин (0,59), Пропазин (0,64), Алахлор (0,66), Метолахлор (0,68)	II слабо мобилен
0,8 — 1,3	Монурон (**) (1,00), Атразин (1,03), Симазин (1,04), Флуометурон (1,18)	III умерено мобилен
1,3 — 2,5	Прометон (1,67), Цианазин (1,85), Бромацил (1,91), Карбутилат (1,98)	IV сравнително мобилен
2,5 — 5,0	Карбофуран (3,00), Диоксакарб (4,33)	V мобилен
> 5,0	Монокротофос (> 5,0), Дикротофос (> 5,0)	VI много мобилен

(*) коефициентът на относителна мобилност се получава, както следва (3):

$$\text{КОМ} = \frac{\text{разстояние на просмукване на изпитвания химикал (cm)}}{\text{разстояние на просмукване на референтния химикал (cm)}}$$

(**) Референтен химикал

+ Други системи за класифициране на мобилността на даден химикал в почвата се основават на стойностите на R_f от тънкослойна хроматография с почва (4) и на стойностите на K_{oc} (5) (6).

- (1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium „Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment.“ Canterbury, UK, 1-3 July 1985.
- (2) Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.
- (3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.
- (4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.
- (5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.
- (6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165-174.

▼ **M6****В.45. ОЦЕНКА НА ЕМИСИИТЕ В ОКОЛНАТА СРЕДА ОТ ДЪРВЕСИНА, ТРЕТИРАНА С КОНСЕРВАНТИ: ЛАБОРАТОРЕН МЕТОД ЗА СТОКИ ОТ ДЪРВЕСИНА, КОИТО НЕ СА ПОКРИТИ И СА В КОНТАКТ СЪС СЛАДКА ИЛИ МОРСКА ВОДА**

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 313 (2007). Емисиите в околната среда от дървесина, третирана с консерванти, трябва да бъдат количествено определени, за да се даде възможност за оценка на риска за околната среда за третирана дървесина. Този метод за изпитване описва лабораторен метод за оценка на емисиите от дървесина, третирана с консерванти, в две ситуации, при които емисиите биха могли да преминат в околната среда:
 - Емисии от третирана дървесина, намираща се в контакт със сладка вода. Емисии от повърхността на третираната дървесина могат да преминат във водата.
 - Емисии от третирана дървесина, намираща се в контакт с морска вода. Емисии от повърхността на третираната дървесина могат да преминат в морската вода.
2. Настоящият метод за изпитване е предназначен за изпитване на емисиите от дървесина и стоки от дървесина, които не са покрити и са в контакт със сладка или морска вода. Класовете на употреба се използват в международен мащаб и категоризират биологичната опасност, която ще се отнася за третираната стока. Класовете на употреба също определят ситуацията, при която се използва третираната стока, и компонентите на околната среда (въздух, вода, почва), които са потенциално застрашени от дървесината, третирана с консерванти.
3. Методът за изпитване представлява лабораторна процедура за вземане на проби (среда за емисии) от вода, използвана за наkisване на третирана дървесина, на увеличаващи се времеви интервали след експозицията. Количеството на емисиите в средата за емисии е свързано с повърхността на дървесината и продължителността на експозицията, с оглед оценка на преминаването в $\text{mg}/\text{m}^2/\text{ден}$. По този начин може да се оцени преминаването (скоростта на отмиване) след увеличаване на периодите на експозиция.
4. Количеството на емисиите може да се използва при оценката на риска за околната среда от третираната дървесина.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

5. Механизмът на отмиването от повърхността на дървесината не е идентичен, по природа и като интензитет, при сладката вода и при морската вода. Поради това за продуктите и смесите за консервиране на дървесина, употребявани за третиране на дървесина, използвана в морска вода, е необходимо проучване за отмиването от дървесина за морска вода.
6. Дървесината, в случая на дървесина, третирана с консервант за дървесина, следва да бъде представителна за дървесината, която се използва за търговски цели. Тя следва да се третира в съответствие с инструкциите на производителя на консерванта и в съответствие със съответните стандарти и спецификации. Параметрите за кондиционирането на дървесината след третиране, преди започване на изпитването, трябва да се посочат.
7. Пробите от дървесината, които се използват, следва да бъдат представителни за стоките, които се използват (напр. по отношение на биологичен вид, плътност и други характеристики).

▼ M6

8. Изпитването може да се прилага върху дървесина, като се използва процес на проникване или повърхностно приложение, или върху третирана дървесина, която е с допълнителна задължителна повърхностна обработка (например боя, който е поставена като изискване за използване за търговски цели).
9. Съставът, количеството, рН и физичната форма на водата са важни при определяне на количеството, съдържанието и естеството на емисиите от дървесината.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

10. Изпитваните образци от дървесина, третирана с консерванти, се накисват във вода. Водата (средата за емисии) се събира и се анализира химически множество пъти по време на периода на експозиция, достатъчни, за да се извършат статистически изчисления. Емисионни потоци в $\text{mg}/\text{m}^2/\text{ден}$ се изчисляват от резултатите от анализите. Периодите на пробовземане следва да се записват. Изпитванията с нетретираните проби могат да бъдат прекратени, ако не се откриват фонове стойности в първите три точки от данни.
11. Включването на образци от нетретирана дървесина дава възможност за определяне, в средите за емисии, на фонове нива за емисии от дървесина, различни от използвания консервант.

КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО**Точност**

12. Точността на метода за изпитване за оценка на емисиите зависи от това дали образците за изпитване са представителни за третираната дървесина на пазара, от представителността на водата по отношение на водата в реални условия и как от представителността на режима на експозиция по отношение на природните условия.
13. Точността, прецизността и повтаряемостта на метода за анализ трябва да бъдат определени преди провеждането на изпитването.

Възпроизводимост

14. Три водни проби се вземат и анализират и средната стойност се взема като стойност на емисиите. Възпроизводимостта на резултатите в рамките на една лаборатория и между различни лаборатории зависи от режима на накисване и от дървесината, използвана като образци за изпитване.

Приемлив диапазон на резултатите

15. Диапазон от резултати от това изпитване, в който най-горните и най-долните стойности се различават с по-малко от един порядък, е приемлив.

УСЛОВИЯ НА ИЗПИТВАНЕ**Вода**

16. Сценарии на отмиване със сладка вода: дейонизирана вода (напр. ASTM D 1193 Type II) се препоръчва за употреба в изпитването за отмиване, когато трябва да бъде оценена дървесина, която е в контакт със сладка вода. Температурата на водата трябва да бъде $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ и измерената стойност на рН и на температурата на водата следва да бъде включена в протокола от изпитването. Анализът на проби от водата, взети преди накисването на третираните образци, позволява оценка на анализирания химикали във водата. Това е контрола за определяне на фоновите нива на химикали, които след това се анализират химически.

▼ M6

17. Сценарии на отмиване с морска вода: синтетична морска вода (напр. ASTM D 1141 Substitute Ocean Water, without Heavy Metals) се препоръчва за употреба в изпитването за отмиване, когато трябва да бъде оценена дървесина, която е в контакт с морска вода. Температурата на водата трябва да бъде $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ и измерената стойност на рН и на температурата на водата следва да бъде включена в протокола от изпитването. Анализът на проби от водата, взети преди наkisването на третираните образци, позволява оценка на анализираниите химикали във водата. Това е контрола за анализа на фоновите нива за химикали, които са от значение.

Образци от дървесина за изпитване

18. Дървесните видове следва да бъдат типични за дървесните видове, използвани за изпитването за ефикасност на консерванти за дървесина. Препоръчаните видове са *Pinus sylvestris* L. (бял бор), *Pinus resinosa* Ait. (вид северноамерикански червен бор) или *Pinus* spp. (бор). При допълнителни изпитвания могат да се използват други биологични видове.
19. Следва да бъде използвана дървесина с прави влакна без чепове. Смолистите на външен вид материали следва да се избягват. Дървесината трябва да бъде типична за дървесината, достъпна в търговската мрежа. Източникът, плътността и броят на годишните пръстени на 10 mm следва да бъдат документирани.
20. Препоръчва се образците от дървесина за изпитване да се определят в серии от по пет образца съгласно размерите по EN 113 (размери 25 mm × 50 mm × 15 mm) с надлъжни страни, успоредни на влакното на дървесината, въпреки че могат да се използват и други размери, например 50 mm на 150 mm на 10 mm. Образецът за изпитване трябва да бъде напълно наkisнат във водата. Образците за изпитване се състоят от 100 % беловина. Всеки образец се маркира по уникален начин, така че да може да бъде разпознаван през цялото време на изпитването.
21. Всички изпитвани образци трябва да бъдат рендосани или надлъжно рязани и повърхностите не трябва да са шлифовани.
22. Броят на сериите от образци от дървесина за изпитване, използван за анализа, е най-малко пет: три серии образци се третира с консерванти, една серия от образци не се третира и една серия от образци се използва за оценка на съдържанието на влага, след сушене в сушилна камера, в образците за изпитване преди третирането. Приготвят се достатъчно образци за изпитване, за да може да се извърши подбор на три серии от екземпляри, които са в рамките на 5 % от средната стойност на поемане на консерванта от обединените образци за изпитване.
23. Краищата на всички образци за изпитване се запечатват с химикал, който не позволява проникване на консервант в края на влакната на образците, или не позволява отмиване от образците чрез краищата на влакната. При прилагането на химикал за запечатването е необходимо да се прави разграничение между образци, използвани за процеси по повърхностно прилагане и такива, използвани за процеси по проникване. Химикалът за запечатване трябва да се прилага преди третиране само в случай на повърхностно прилагане.
24. Краищата на влакната не трябва да бъдат запечатвани при третиране чрез процеси по проникване. Поради това краищата на образците трябва да бъдат запечатвани в края на периода на кондициониране. Оценката на емисията трябва да се прави само за надлъжната повърхност. Химикалите за запечатване следва да бъдат проверени и, ако е необходимо, приложени отново преди започване на отмиването, но не трябва да бъдат прилагани отново след започването на отмиването.

▼ **M6****Контейнер за накисване**

25. Контейнерът е направен от инертен материал и е достатъчно голям, за да побере 5 образца от дървесина с размери по EN 113 в 500 ml вода, което води до отношение на повърхността към обема вода от 0,4 cm²/ml.

Установка за изпитване на образците

26. Образците за изпитване се държат върху установка, която дава възможност всички експонирани повърхности на образца да са в контакт с водата.

ПРОЦЕДУРА ЗА ТРЕТИРАНЕ С КОНСЕРВАНТ**Приготвяне на образци за изпитване, третиран с консервант**

27. Образецът за изпитване от дървесина, който следва да бъде третиран с изпитвания консервант, се третира по метода, определен за консерванта, който може да е с процес на третиране с проникване, или с процес по повърхностно прилагане, който от своя страна може да бъде с потапяне, с напръскване или с нанасяне с четка.

Консерванти, които се прилагат при процес на третиране с проникване

28. Трябва да бъде приготвен разтвор на консерванта, с който, при прилагане чрез процеса на третиране с проникване, ще се постигне определеното поемане. Образецът за изпитване от дървесина се претегля и се определят размерите му. Процесът на третиране с проникване трябва да се извършва така, както е определено за прилагането на консервант за дървесина за използване в клас на употреба 4 или 5. Образецът се претегля отново след третирането и поемането на консерванта (kg/m³) се изчислява по уравнението:

$$\frac{\text{Маса след третиране(kg)} - \text{Маса преди третиране(kg)}}{\text{Обем на образца за изпитване(m}^3\text{)}} \times \frac{\text{Концентрация на разтвора(\% маса/маса)}}{100}$$

29. Следва да се отбележи, че в това изпитване може да се използва дървен материал, третиран в инсталация за промишлено третиране (напр. чрез импрегниране под налягане с използване на вакуум). Процедурите, които се използват, трябва да бъдат записани и поемането на материал, третиран по този начин, трябва да бъде анализирано и записано.

Консерванти, които се прилагат при процеси по повърхностно прилагане

30. Процесите по повърхностно прилагане по отношение на образци от дървесина за изпитване включват тяхното потапяне, напръскване или нанасяне с четка. Процесът и приложеното количество (напр. в литри/m²) следва да са такива, каквито са специфицирани за повърхностното прилагане на консерванта.
31. Също така следва да се отбележи в този случай, че в това изпитване може да се използва дървен материал, третиран в инсталация за промишлено третиране. Процедурите, които се използват, трябва да бъдат записани и поемането на материал, третиран по този начин, трябва да бъде анализирано и записано.

Кондициониране на образците за изпитване след третирането

32. След третирането, третираните образци за изпитване следва да бъдат кондиционирани в съответствие с препоръките на доставчика на изпитвания консервант според изискванията, посочени върху етикета на консерванта, или в съответствие с търговските практики при третирането, или в съответствие със стандарт EN 252.

▼ M6**Приготвяне и подбор на образци за изпитване**

33. След кондиционирането, следващо третирането, се изчислява средното поемане в групата от образци за изпитване и, с цел измерване на отмиването, на случаен принцип се избират три представителни серии от образци със стойност на поемането в рамките на 5 % от средната стойност за групата.

ПРОЦЕДУРА ЗА ИЗМЕРВАНЕ НА ЕМИСИИТЕ НА КОНСЕРВАНТИ**Метод чрез накисване**

34. Образците за изпитване се претеглят и след това се накисват изцяло във водата, като се записват датата и времето. Контейнерът се покрива, за да се намали изпарението.
35. Водата се заменя на следните интервали: 6 часа, 1 ден, 2 дни, 4 дни, 8 дни, 15 дни, 22 дни, 29 дни (Забележка: това е общо време, не интервали от време). Часът и датата на замяната на водата, както и масата на водата, извлечена от контейнера, следва да бъдат записани.
36. За последващ химичен анализ, след всяка замяна на вода се взема проба от водата, в която е била накисната серията от образци.
37. Процедурата по вземане на проби позволява изчисляването на профила на количеството емисии спрямо времето. Пробите следва да се съхраняват при условия, които запазват анализа, напр. в хладилник на тъмно с оглед намаляване на микробния растеж в пробата преди анализа.

ИЗМЕРВАНИЯ НА ЕМИСИИ**Третирани проби**

38. Извършва се химичен анализ на взетата вода за активното вещество и/или относими продукти от разграждане/трансформация, ако е приложимо.

Нетретирани проби

39. Вземането на проба от водата (средата за емисии) в тази система, и последващият анализ на химикалите, отмити от пробите от нетретирана дървесина проби, позволяват оценка на възможния емисионен поток от консерванти от нетретирана дървесина. Вземането на проби от средата за емисии и анализът им след периоди на експозиция с увеличаваша се продължителност дава възможност за оценка на скоростта на изменение във времето на емисионния поток. Този анализ е процедура за контрол, за да се определят фонов нива на изпитвания химикал в нетретирана дървесина, за да се потвърди, че дървесината, използвана като източник на пробите, не е била предварително третирана с консерванта.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Химични анализи**

40. Извършва се химичен анализ на взетата проба от водата и резултатът от анализа на водата се изразява в подходящи мерни единици, например в $\mu\text{g/l}$.

Протоколиране на данни

41. Всички резултати се записват. В допълнението е даден пример за препоръчителен формуляр за една серия от третирани образци за изпитване, както и обобщена таблица за изчисляване на средните стойности на емисиите за всеки интервал на пробовземане.
42. Дневното преминаване на емисии в $\text{mg/m}^2/\text{ден}$ се изчислява, като се вземе средната стойност от трите измервания от трите повторения и се раздели на броя на дните на накисване.

▼ **M6****Протокол от изпитването**

43. В протокола от изпитването следва да бъде предоставена най-малко следната информация:

- името на доставчика на изпитвания консервант;
- специфичното и уникално наименование или кодът на изпитвания консервант;
- търговското или общоприетото наименование на активната съставка (или съставки) с общо описание на другите коформуланти (напр. съразтворител, смола), и състава в % (m/m) на компонентите;
- относимата стойност на поемането или нанасянето (в kg/m^3 или $1/\text{m}^2$ съответно), определена за дървесина, използвана при контакт с вода;
- биологичният вид за използваната дървесина, с плътност и скорост на растеж в брой годишни пръстени на 10 mm;
- стойностите на нанасянето или поемането на изпитвания консервант, и формулата, използвана за изчисляване на поемането, изразени в $1/\text{m}^2$ или kg/m^3 ;
- методът на прилагане на консерванта, определянето на график на третирането, използван за процеса на проникване, и методът на прилагане, ако е използвано повърхностно третиране;
- датата на прилагане на консерванта и оценка на съдържанието на влага на образците за изпитване, изразено като процент;
- използваните процедури на кондициониране, с посочване на типа, условията и продължителността;
- посочване на използвания химикал за запечатване и колко пъти е приложен;
- посочване на всякакво последващо третиране на дървесината, напр. спецификация на доставчика, тип, характеристики и нанасяне на боя;
- часът и датата на всяко накисване, количеството вода, което се използва за накисване на образците за изпитване при всяко потапяне, и количеството на водата, абсорбирана от дървесината по време на накисването;
- Всяко отклонение от описания метод и всякакви фактори, които може да са повлияли на резултатите.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) European Standard, EN 84 — 1997. Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.
- (2) European Standard, EN 113/A1 — 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.
- (3) European Standard, EN 252 — 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.
- (4) European Standard, EN 335 — Part 1: 2006. Durability of wood and wood-based products — Definition of use classes — Part1: General.
- (5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 — 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.
- (6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II — 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

▼ **M6***Допълнение 1***Формуляр за записване за метод за изпитване**

Оценка на емисиите в околната среда от дървесина, третирана с консерванти: лабораторен метод за стоки от дървесина, които не са покрити и са в контакт със сладка или морска вода

Изпитваща лаборатория	
Консервант за дървесина	
Доставчик на консерванта	
Специфично и уникално наименование или код на консерванта;	
Търговско или общоприето наименование на консерванта	
Коформуланти	
Относимо поемане за дървесина, използвана в контакт с вода	
Прилагане	
Метод за прилагане	
Дата на прилагане	
Формула, използвана за изчисляване на поемането:	
Процедура по кондициониране	
Продължителност на кондиционирането	
Химикал за запечатване/колко пъти е приложен	
Последващо третиране	ако е приложимо
Образци за изпитване	
Дървесни видове	
Плътност на дървесината	(минимална ... средна ... максимална стойност)
Скорост на растеж (пръстени на 10 mm)	(минимална ... средна ... максимална стойност)
Съдържание на влага	

▼ **M6**

Установки за изпитване (*)	Поемане (напр. kg/m ³)
Третирано „x“	Средна стойност и стандартно отклонение, или размах за 5 образца
Третирано „y“	Средна стойност и стандартно отклонение, или размах за 5 образца
Третирано „z“	Средна стойност и стандартно отклонение, или размах за 5 образца
Нетретирано	
Вариране на параметрите на метода за изпитване	Например качество на водата, размери на образците за изпитване и др.
(*) x, y, z представляват трите повторения	

▼ M6

Време	Замяна на вода	Маса на образца		Поемане на вода		Водна проба				
		Третиран (средно)	Нетретиран	Третиран (средно)	Нетретиран		Вода за изпитването	x	y	z
	Дата	g	g	g	g	№	pH	pH	pH	pH
Стартиране										
6h						1				
24h						2				
2 d						3				
4 d						4				
8 d						5				
15 d						6				
22 d						7				
29 d						8				

▼ **M6**

Изготвят се отделни таблици за всяка активна съставка (акт.с.)

Време	Замяна на вода	Резултати от анализа													
		Нетретираны образци			Третираны образци										
		Концентрация акт.с. във вода: mg/l	Количество емисии mg/m ²	Емисионен поток mg/m ² /d	Концентрация акт.с. във вода:				Количество емисии				Емисионен поток		
					x	y	z	Средна	x	y	z	Средна	x	y	z
Дата			mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ² /d	mg/m ² /d	mg/m ² /d	mg/m ² /d	
6h															
24h															
2 d															
4 d															
8 d															
15 d															
22 d															
29 d															

Забележка: Тъй като може да се наложи резултатите от нетретираните проби да се използват за коригиране на емисионния поток от третираны проби, резултатите за нетретираните трябва да са на първо място и всички стойности за третираните проби би следвало да бъдат „коригирани стойности“. Също така може да има корекция за първоначалния анализ на водата.

▼ M6

Допълнение 2

Определения

Химикал: Вещество или смес.

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

▼ **M6****V.46. БИОАКУМУЛАЦИЯ В БЕНТОСНИ ОЛИГОХЕТИ, ОБИТАВАЩИ СЕДИМЕНТИ**

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 315 (2008) Хранещият се със седименти ендобентос може да бъде експониран на свързани със седиментите вещества (1). Сред тези хранещи се със седименти водните олигохети играят важна роля на дъното на водните системи. Те обитават седименти и често са най-разпространените видове, най-вече в местообитанията с условия на околната среда, неблагоприятни за други животни. Чрез биотурбация на седиментите и като служат за жертви на други животни, тези животни могат да окажат силно влияние върху бионаличността на такива вещества за други организми, като рибите, хранещи се с бентос. За разлика от епибентосните организми, ендобентосните водни олигохети се заравят в седимента и поглъщат частици от него под повърхността му. Поради това тези организми са експонирани на вещества чрез много пътища на поемане, включително пряк контакт, поглъщане на замърсени частици от седимента, водата между частиците на седимента и водата над седимента. Някои видове бентосни олигохети, които понастоящем се използват в екотоксикологичните изпитвания, са описани в допълнение 6.
2. Параметрите, които характеризират биоаккумуляцията на дадено вещество, включват най-напред коефициента на биоаккумуляция (BAF), константата на скоростта на поглъщане от седимента (k_s) и константата на скоростта на елиминиране (k_e). Подробни определения на тези параметри са дадени в допълнение 1.
3. За оценка на потенциала за биоаккумуляция на веществата като цяло, и за проучване на биоаккумуляцията на веществата, които имат склонност към разпределение във или върху седиментите, е необходим метод за изпитване, специфичен за компонента от средата (1) (2) (3) (4).
4. Настоящият метод за изпитване е предназначен за оценка на биоаккумуляцията на свързани със седимента вещества в ендобентосни олигохети. Изпитваното вещество се добавя към седимента. Използването на седимент с добавка цели да симулира замърсен седимент.
5. Настоящият метод се основава на съществуващите методи за изпитване на токсичността на седименти и биоаккумуляцията (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Други полезни документи са: обсъжданията и резултатите от международен семинар (11) и резултатите от международно кръгово изпитване (12).
6. Настоящото изпитване се прилага по отношение на стабилни, неутрални органични вещества, които имат склонност да се свързват със седименти. Биоаккумуляцията на свързани със седименти стабилни органометални съединения също може да бъдат измерена с настоящия метод (12). Той не се прилага за метали и други микроелементи (11) без модифициране на плана на изпитването по отношение на субстрата и обема на водата, и евентуално на размера на тъканната проба.

НЕОБХОДИМО УСЛОВИЕ И ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

7. Понастоящем на разположение са само няколко добре установени количествени зависимости структура-активност (QSAR) по отношение на процесите на биоаккумуляция (14). Най-широко използваната зависимост е корелацията между биоаккумуляцията и биоконцентрацията на стабилни органични вещества и съответно тяхната липофилност (изразена като логаритъм от коефициента на разпределение октанол-вода ($\log K_{ow}$); вж. допълнение 1 за определение), която е разработена за описание на разпределението на дадено вещество между вода и риби. С използване на тази зависимост са установени също и корелации за

▼ M6

седимента като компонент (15) (16) (17) (18). Корелацията $\log K_{ow}$ - $\log BCF$ като основна QSAR може да бъде полезна за първоначална предварителна оценка на потенциала за биоаккумуляция на свързани със седимента вещества. Независимо от това BAF може да бъде повлиян от съдържанието на липиди в изпитвания организъм и от съдържанието на органичен въглерод в седимента. Поради това като основен фактор за определяне на биоаккумуляцията на свързани със седимента органични вещества също може да се използва коефициентът на разпределение органичен въглерод-вода (K_{oc}).

8. Настоящото изпитване е приложимо за:
 - стабилни органични вещества със стойности на $\log K_{ow}$ между 3,0 и 6,0 (5)(19) и свръхлипофилни вещества, при които $\log K_{ow}$ е по-голям от 6,0 (5);
 - вещества, принадлежащи към клас органични вещества, за които е известно, че имат потенциал за биоаккумуляция в живи организми, напр. повърхностноактивни или силно адсорбиращи се вещества (напр., такива с високо K_{oc}).

9. Информация за изпитваното вещество като напр. мерки за безопасност, правилни условия за съхранение и стабилност, и методи за анализ, следва да бъде получена преди започването на изследването. Насоки относно изпитвани вещества, чиито физични и химични свойства затрудняват тяхното изпитване, са дадени в (20) и (21). Преди извършването на изпитване за биоаккумуляция с водни олигохети следва да е налице следната информация за изпитваното вещество:
 - общоприето наименование, химично наименование (за предпочитане по IUPAC) структурна формула, номер по CAS, чистота;
 - разтворимост във вода [метод за изпитване A.6 (22)];
 - коефициент на разпределение октанол-вода, K_{ow} [методи за изпитване A.8 и A.24 (22)];
 - коефициент на разпределение седимент-вода, изразен като K_d или K_{oc} [метод за изпитване B.19 (22)];
 - хидролиза [метод за изпитване B.7 (22)];
 - фототрансформация във вода (23);
 - парно налягане [метод за изпитване A.4 (22)];
 - пълна биоразградимост [методи за изпитване B.4 и B.29 (22)];
 - повърхностно напрежение [метод за изпитване A.5 (22)];
 - критична концентрация на мицели (24).

В допълнение би била относима и следната информация, където е на разположение:

 - биоразграждане във водна среда [методи за изпитване B.24 и B.25 (22)];
 - константа по закона на Хенри.

10. Изотопно белязаните изпитвани вещества могат да улеснят анализа на водата, седимента и биологичните проби, и могат да се използват за определяне дали да се правят идентификация и количествено определяне на продукти от разграждането. Описаният тук метод е валидиран в международно кръгово изпитване (12) на вещества, белязани с изотоп ^{14}C . Ако се измерват общите радиоактивни остатъци, коефициентът на биоаккумуляция (BAF) се основава на базовото вещество, включително всеки задържан продукт от разграждането. Възможно е също да се комбинира изследване на метаболизма с проучване за биоаккумуляция чрез анализ и количественото определяне

▼ M6

на процентното съдържание на базовото вещество и продуктите от разграждането му в проби, взети в края на фазата на поглъщане или при максимална степен на биоаккумуляция. Във всички случаи се препоръчва изчислението на BAF да се прави въз основа на концентрацията на базовото вещество в организмите, а не само в общите радиоактивни остатъци.

11. В допълнение към свойствата на изпитваното вещество, друга изисквана информация е токсичността към видовете олигохети, които ще се използват в изпитването, като медианна летална концентрация (LC_{50}) за времето, необходимо за фазата на поглъщане, за да се гарантира, че избраните концентрации на експозиция са много по-ниски от токсичните нива. Следва да се предпочитат, ако такива са налице, стойности на токсичността, изведени от дългосрочни изследвания върху сублетални крайни точки (EC_{50}). Ако не са налице такива данни, полезна информация може да предоставят изпитване за остра токсичност при условия, идентични с условията на изпитването за биоаккумуляция, или данни за токсичността на други заместващи биологични видове.
12. Следва да е наличен подходящ метод за анализ, чиито точност, прецизност и чувствителност при количественото определяне на веществото в изпитвателните разтвори, в седиментите 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 за изпитваното вещество във водата, в седиментите и в тъканите на червеите трябва също да са известни. Когато се използва изотопно белязано изпитвано вещество, трябва да се познава специфичната радиоактивност (т.е., $Bq\ mol^{-1}$), разположението на белязания атом и процентът радиоактивност, свързан с онечистванията. Специфичната радиоактивност на изпитваното вещество следва да е колкото е възможно по-висока, за да се откриват възможно най-ниски стойности на концентрациите на изпитване (11).
13. Трябва да е на разположение информация относно характеристиките на седименти, предназначени да бъдат използвани (напр. произход на седимента или съставките му, рН и концентрация на амоняк във водата между частиците на седимента (седименти в полеви условия), съдържание на органичен въглерод (ГОС), зърнометричен състав (процент на пясък, прах и глина), и % сухо тегло) (6).

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

14. Тестът се състои от две фази: фаза на поглъщане (експозиция) и фаза на елиминиране (след експозиция). По време на фазата на поглъщане червеите се експонират на седимент с добавка от изпитваното вещество, покрит с възстановена вода и при достигнато равновесие, както е подходящо (11). Контролни групи от червеи се държат при идентични условия, но без изпитваното вещество.
15. За фазата на елиминиране червеите се прехвърлят в система седимент-вода, несъдържаща изпитваното вещество. Фазата на елиминиране е необходима за получаване на информация за скоростта, при която изпитваното вещество се екскретира от изпитваните организми (19)(25). Фазата на елиминиране е необходима във всички случаи, освен ако поглъщането на изпитваното вещество по време на фазата на експозиция не е било значимо (напр. няма статистическа разлика между концентрацията на изпитваното вещество в изпитваните червеи и в червеите от контролите). Ако по време на фазата на поглъщане не бъде достигнато стационарно състояние, определянето на кинетичните параметри — BAF_k , константата/ите на скоростта на поглъщане и елиминиране — може да се извърши с използване на резултатите от фазата на елиминиране. Изменението на концентрацията на изпитваното вещество във/върху червеите се следи по време на цялото изпитване в двете му фази.
16. По време на фазата на поглъщане измерванията се извършват до достигането от BAF на плато или стационарно състояние. По подразбиране, продължителността на фазата на поглъщане следва да е 28 дни. Практическият опит показва, че фаза на поглъщане от 12 до 14 дни е достатъчна за достигане на стационарно състояние при няколко стабилни, неутрални органични вещества (6) (8) (9).

▼ M6

17. Ако обаче не е достигнато стационарно състояние в рамките на 28 дни, фазата на елиминиране се започва чрез прехвърляне на експонираните олигохети в съдове, които съдържат същата среда без изпитваното вещество. Фазата на елиминиране се прекратява от момента, когато се достигне 10 % ниво на концентрация, измерена в червеите в ден 28 от фазата на поглъщане, или след максимален срок от 10 дни (d). Нивото на остатъци в червеите в края на фазата на елиминиране се отчита като допълнителна крайна точка, например като неелиминирани остатъци (NER). За предпочитане е коефициентът на биоаккумуляция (BAF_{ss}) да се изчислява както като съотношение между концентрацията в червеите (C_a) и концентрацията в седимента (C_s) при видимо стационарно състояние, така и като кинетичен коефициент на биоаккумуляция BAF_K , т.е., като съотношение между константата на скоростта на поглъщане от седимента (k_s) и константата на скоростта на елиминиране (k_e), като се предполага кинетика от първи порядък. Когато не е достигнато стационарно състояние в рамките на 28 дни, BAF_K се изчислява от константата(ите) на скоростта на поглъщане и на елиминиране. За изчисление вж. допълнение 2. Ако не е приложима кинетика от първи порядък, следва да се използват по-сложни модели (допълнение 2 и препратка (25)).
18. Ако не е достигнато стационарно състояние в рамките на 28 дни, фазата на поглъщане може по избор да се удължи чрез подлагане на експонираните групи червеи — при наличност — на последващи измервания, докато не бъде достигнато стационарно състояние; успоредно с това и независимо от това фазата на елиминиране следва все пак да бъде започната в ден 28 от фазата на поглъщане.
19. Константата на скоростта на поглъщане, константата на скоростта на елиминиране (или константите, когато се използват по-сложни модели), кинетичният коефициент на биоаккумуляция (BAF_K), и, когато е възможно, доверителните граници на всеки един от тези параметри, се изчисляват с помощта на уравнения от информатизирани модели (вж. допълнение 2 за модели). Пригодността на даден модел може да се определи от коефициента на корелация или от коефициента на детерминация (коефициенти, чиито стойности са близки до единица, показват добра пригодност).
20. За да се намали варирането на резултатите от изпитването за органични вещества с висока липофилност, коефициентите на биоаккумуляция следва да се изразяват в допълнение по отношение на съдържанието на липиди в изпитваните организми и към съдържанието на органичен въглерод (TOC) в седимента (коефициент на акумулация биота-седимент, или BSAF, в kg TOC в седимента на kg (kg^{-1}) съдържание на липиди в червеите). Този подход се основава на опита и на теоретични корелации за водната среда като компонент на околната среда, при които — за някои класове химични вещества — има ясна зависимост между потенциала за биоаккумуляция на веществото и липофилността му, което е добре изяснено при използване на риби като организми за модела (14) (25) (27). Има също и връзка между съдържанието на липиди в изпитваните риби и наблюдаваната биоаккумуляция на такива вещества. За бентосните организми са установени сходни корелации (15)(16)(17)(18). Ако е налице достатъчно количество тъкан от червеи, липидното съдържание на изпитваните животни може да се определи върху същия биологичен материал като използвания за определяне на концентрацията на изпитваното вещество. Независимо от това е практично да се използват аклиматизирани контролни животни най-малко в началото или — за предпочитане — в края на фазата на поглъщане, за измерване на съдържанието на липиди, стойността от което да се използва за нормализиране на стойностите на BAF.

ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

21. За да бъде тестът валиден, се прилагат следните условия:
- Кумулативната смъртност на червеите (контроли и третираны проби) до края на изпитването не трябва да превишава 20 % от първоначалния брой.
 - Освен това следва да се докаже, че червеите се заравят в седимента, за да се даде възможност за максимална експозиция. За подробно обяснение вж. точка 28.

▼ **M6****ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА****Животински видове за изпитването**

22. За изпитването могат да се използват няколко вида водни олигохети. Най-често използваните видове са изброени в допълнение 6.
23. Изпитвания за токсичност (96 h, само във вода) следва да се извършват на редовни интервали (например всеки месец) с референтно токсично вещество като калиев хлорид (KCl) или меден сулфат (CuSO₄) (1) за доказване на здравословното състояние на изследваните животни (1) (6). Ако референтните токсикологични изпитвания не се извършват на редовни интервали от време, партидата на организми, които трябва да се използват за изпитване на биоаккумуляцията в седимента, трябва да се провери с помощта на референтно токсично вещество. Измерването на съдържанието на липиди може също да предостави полезна информация относно състоянието на животните.

Отглеждане на изпитваните организми

24. С цел да се разполага с достатъчен брой червеи за провеждане на изпитвания за биоаккумуляция, може да е необходимо червеите да се държат като постоянни едновидови култури, отглеждани в лабораторни условия. За избраните за изпитване биологични видове, методите за отглеждане в лабораторни условия култури са обобщени в допълнение 6. За подробности вж. позовавания (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32).

Апаратура

25. Трябва внимателно да се избягва използването на материали за всички части от оборудването, които могат да разтворят или абсорбират изпитваните вещества, или да освободят други вещества и да окажат неблагоприятно въздействие върху изпитваните животни. Могат да се използват стандартни правоъгълни или цилиндрични камери, изработени от химически инертен материал и с подходящ капацитет в зависимост от степента на зареждане, т.е., на броя на изпитваните червеи. Използването на тръби от мека пластмаса за подаване на вода или въздух следва да се избягва. За оборудването, което влиза в контакт с изпитвателната среда, следва да се използват политетрафлуороетилен, неръждаема стомана и/или стъкло. За вещества 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 (5). За изотопно белязани изпитвани вещества и за летливи вещества се полагат грижи да се избегне отстраняването и изпускането на отстраненото изпитвано вещество. Следва да се използват уловители (напр. стъклени бутилки за промиване на газове), които съдържат подходящи абсорбенти за задържане на остатъците, изпаряващи се от изпитвателните камери.

Вода

26. Водата над седимента трябва да има качество, което да позволява преживяването на избраните изпитвани видове за периодите на аклиматизация и изпитване, без те да показват необичаен външен вид или поведение. Водата, възстановена съгласно метод за изпитване В.1 (25), се препоръчва за използване като вода над седимента при изпитванията, както и в лабораторните култури от червеи. Доказано е, че няколко изпитвани вида могат да преживеят, нарастват и се размножават в този вид вода (8), и е предоставено максимално стандартизиране на условията на изпитване и отглеждане. Водата трябва да се характеризира поне чрез рН, проводимост и твърдост. Анализът на водата за микрозамърсители преди нейната употреба би могъл да предостави полезна информация (допълнение 4).
27. Водата трябва да има постоянно качество по време на целия период на изпитването. Стойността на рН на водата над седимента следва да бъде между 6 и 9. Общата твърдост следва да е между 90 и 400 mg/l калциев карбонат (CaCO₃) в началото на изпитването (7). Диапазоните на рН и твърдостта в споменатата възстановена вода са дадени в метод за

▼ M6

изпитване В.1 (25). Ако се предполага взаимодействие между отговорните за твърдостта йони и изпитваното вещество, следва да се използва вода с по-ниска твърдост. В допълнение 4 са обобщени допълнителните критерии за вода, приемлива за използване за разреждане в съответствие с насоки ОИСП № 210 (34).

Седимент

28. Седиментът трябва да е с качество, което да позволява преживяването и, за предпочитане, размножаването на изпитваните организми по време на периодите на аклиматизация и изпитване, без те да показват необичаен външен вид или поведение. Червеите трябва да се заравят в седимента. Поведението на червеите във връзка със заравянето може да окаже влияние върху експозицията, а оттам и върху ВАФ. Поради това избягването на седимента или поведението на червеите по отношение на заравянето следва да се записват, когато мътността на водата над седимента позволява такива наблюдения. Червеите (контролни и третиранни) трябва да се заравят в седимента в срок от 24 h след добавянето в съдовете за изпитване. Ако се наблюдава постоянно незаравяне или избягване на седимента (напр. повече от 20 % за повече от половината от фазата на поглъщане), това означава, че условията на изпитването не са подходящи или че изпитваните организми не са здрави, или че концентрацията на изпитваното вещество води до това поведение. В такъв случай изпитването трябва да се прекрати и повтори при подобрени условия. Допълнителна информация за поглъщане на седимент може да бъде получена чрез използването на методи, описани в (35)(36), в които се уточняват поглъщането на седимент или изборът на частици при изпитваните организми. Наличието или отсъствието, ако се наблюдава такова, на фекални пелети по повърхността на седимента, които показват поглъщане на седимент от червеите, следва да бъдат записвани и вземани предвид при интерпретирането на резултатите от изпитването по отношение на пътищата на експозиция.
29. Изкуствен седимент въз основа на изкуствената почва, описана в метод за изпитване В.8 (40), се препоръчва за употреба както в изпитванията, така и в лабораторните култури от червеи (допълнение 5), тъй като естествени седименти с подходящо качество може да не са налични през цялата година. В допълнение, местни организми, както и евентуалното наличие на микрозамърсители в естествени седименти, могат да повлияят на изпитването. Някои изпитвани биологични видове могат да преживеят, нарастват и се размножават в изкуствен седимент (8).
30. Изкуственият седимент следва да бъде характеризирани най-малко по отношение на произхода на съставките, механичния състав (процент на пясък, прах и глина), общото съдържание на органичен въглерод (ТОС), съдържанието на вода и рН. Измерването на редокси потенциала е по избор. Естествени седименти от незамърсени места обаче могат да бъдат използвани като седимент за изпитванията или за отглеждане (1). Естествените седименти следва да бъдат характеризирани най-малко по отношение на произхода им (място, от което са взети), рН и амоняк във водата между частиците на седимента, съдържанието на органичен въглерод (ТОС), механичния състав (процент на пясък, прах и глина) и процента на съдържание на вода (6). Препоръчва се, преди добавянето на изпитваното вещество, естественият седимент да бъде аклиматизиран в продължение на седем дни при същите условия, които ще преобладават при последващото провеждане на изпитване, ако се очаква изменение в стойностите на амоняка. В края на този период за аклиматизация водата над седимента следва да се отстрани и изхвърли. Полезна информация преди използването на седимент може да се получи от анализа на седимента или на компонентите му за микрозамърсители.

Приготвяне

31. Боравенето с естествени седименти преди употребата им в лабораториите е описано в (1), (6) и (44). Приготвянето на изкуствен седимент е описано в допълнение 5.

▼ M6*Съхранение*

32. Съхранението на естествените седименти в лабораторията следва да бъде възможно най-кратко. ЕРА на САЩ (6) препоръчва максимален срок на съхранение от 8 седмици при 4 ± 2 °C на тъмно. Не следва да има свободно пространство над седимента в съдовете за съхранение. Препоръки за съхранение на изкуствен седимент са дадени в допълнение 5.

Прилагане на изпитваното вещество

33. Към седимента се добавя изпитваното вещество. Процедурата за добавяне, включва покриване на една или повече от съставките на седимента с изпитваното вещество. Например, кварцовият пясък, или част от него (напр. 10 g кварцов пясък за всеки съд за изпитване), може да бъде намокнат в разтвор на изпитваното вещество в подходящ органичен разтворител, който след това бавно се изпарява до изсушаване. След това така нанесената фракция се смесва с влажния седимент. Количеството пясък, добавен чрез сместа изпитвано вещество—пясък, трябва да се вземе предвид при приготвянето на седимента, т.е. седиментът трябва следователно да се приготви с по-малко количество пясък (6).
34. При естествен седимент изпитваното вещество може да се прибави чрез добавяне в изсушена част от седимента, както е описано по-горе за изкуствения седимент, или чрез размесване на изпитваното вещество във влажния седимент с последващо изпаряване на евентуалното използвано средство за повишаване на разтворимостта. Подходящи разтворители за добавяне към влажен седимент са етанол, метанол, монометилол етер на етиленгликол, диметилов етер на етиленгликол, диметилформамид и триетиленгликол (5)(34). Токсичността и летливостта на разтворителя, а също и разтворимостта на изпитваното вещество в избрания разтворител следва да са главните критерии за избор на подходящо средство за повишаване на разтворимостта. Допълнителни насоки относно процедурите за добавяне се съдържат в „Environment Canada (1995)“ (41). Трябва да се внимава изпитваното вещество, добавено към седимента, да бъде старателно и равномерно разпределено в рамките на седимента. Повторните подпроби от седимент с добавка следва да бъдат анализирани, за да се проверят концентрациите на изпитваното вещество в седимента и да се определи степента на хомогенност на разпределението на изпитваното вещество.
35. След като е приготвен седиментът с добавка, заедно с водата над седимента, желателно е да се даде възможност изпитваното вещество да се разпредели между седимента и течната фаза. За препоръчване е това да стане при температурата и аерирането, използвани при изпитването. Подходящото време за установяване на равновесие зависи от седимента и веществото и може да варира от няколко часа до дни, дори до няколко (4—5) седмици в редки случаи (28)(42). В това изпитване не се чака до достигане на равновесие, но се препоръчва период за достигане на равновесие от 48 часа до 7 дни. В зависимост от целта на изследването, например когато трябва да се симулират условията в околната среда, седиментът с добавката може да се остави за по-дълъг период с оглед достигане на равновесие или зреене (11).

ПРОВЕЖДАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**Предварително изпитване**

36. Може да е полезно да се извърши предварителен опит с цел да се оптимизират условията на изпитване при окончателното изпитване, например избор на концентрация(и) на изпитваното вещество и продължителност на фазите на поглъщане и елиминиране. Поведението на червеите, например избягването на седимента (т.е., червеите напускат седимента), което може да се дължи на изпитваното вещество и/или на

▼ **M6**

седимента, следва да се наблюдава и записва по време на предварителното изпитване. Избягването на седимента може също да бъде използвана като сублетален параметър в предварително изпитване за оценка на концентрация(и) на изпитваното вещество, които да се използват при изпитване за биоаккумуляция.

Условия на експозиция*Продължителност на фазата на поглъщане*

37. Изпитваните организми се излагат на въздействието на изпитваното вещество по време на фазата на поглъщане. Първата проба следва да се вземе от 4 до 24 часа след началото на фазата на поглъщане. Фазата на поглъщане следва да се провежда до 28 дни (1)(6)(11), освен ако може да се докаже, че равновесието е постигнато по-рано. Стационарното състояние е достигнато, когато: i) кривата на коефициентите на биоаккумуляция през всеки период на пробовземане като функция на времето стане успоредна на оста на времето; ii) три последователни анализа на ВАФ, извършени върху проби, взети на интервали от най-малко два дни, варират с не повече от $\pm 20\%$ един от друг; и iii) не съществуват значими разлики между трите периода на вземане на проби (въз основа на статистически сравнения, напр. дисперсионен анализ и регресионен анализ). Ако стационарното състояние не се постигне за 28 дни, фазата на поглъщането може да бъде преустановена чрез започване на фазата на елиминиране, и ВАФ_к може да се изчисли въз основа на константите на скоростта на поглъщане и елиминиране (вж. също точки 16-18).

Продължителност на фазата на елиминиране

38. Първата проба следва да се вземе от 4 до 24 часа след началото на фазата на елиминиране, тъй като през началния период могат да възникнат бързи промени в тъканните остатъци. Препоръчва се фазата на елиминиране да се прекрати или когато концентрацията на изпитваното вещество стане по-малко от 10% от концентрацията в стационарно състояние, или след максимален срок от 10 дни. Нивото на остатъците в червеите в края на фазата на елиминиране се протоколира като вторична крайна точка. Периодът може обаче да се регулира чрез периода, през който концентрацията на изпитваното вещество в червеите остава над границата на откриване на метода за анализ.

Изпитвани организми*Брой на изпитваните червеи*

39. Броят на червеите във всяка проба трябва да предоставя маса от тъкани на червеи по такъв начин, че масата на изпитваното вещество на проба съответно в началото на фазата на поглъщане и в края на фазата на елиминиране да е значително по-висока от границата на откриване за изпитваното вещество в биологичен материал. В посочените етапи на фазите на поглъщане и елиминиране концентрацията в опитните животни обикновено е относително ниска (6) (8) (18). Тъй като индивидуалните тегла на много видове водни олигохети са много ниски (5-10 mg влажно тегло на индивид за *Lumbriculus variegatus* и *Tubifex tubifex*), червеите от дадена камера за изпитване, съдържаща повторение, могат да бъдат обединени за претеглянето и химичния анализ при изпитването. За изпитвани видове с по-високо индивидуално тегло (напр. *Branchiura sowerbyi*) може да се използват повторения, съдържащи един индивид, но в такива случаи броят на повторенията следва да бъде увеличен до пет на точка за пробовземане (11). Независимо това следва да се отбележи, че видът *B. sowerbyi* не е бил включен в кръговото изпитване (12) и следователно не се препоръчва като предпочитан биологичен вид в метода.
40. Следва да бъдат използвани червеи със сходен размер (за *L. variegatus* вж. допълнение 6). Те трябва да идват от един и същ източник, и да бъдат полово зрели или големи животни от същия възрастов клас (вж. допълнение 6). Теглото и възрастта на животното могат да имат значимо въздействие върху стойностите на ВАФ (напр. поради различното съдържание на липиди и/или наличието на яйца); тези параметри следва да се записват старателно. За измерване средното влажно и средното сухо тегло подизвадка от червеи следва да се претегли преди началото на изпитването.

▼ M6

41. При *Tubifex tubifex* и *Lumbriculus variegatus* през периода на изпитването се очаква размножение. Липсата на размножаване в изпитването за биоаккумуляция трябва да бъде записана и да се вземе под внимание, когато се интерпретират резултатите от изпитването.

Зареждане

42. Следва да се използват високи съотношения „седимент към червей“ и „вода към червей“, за да се сведе до минимум намаляването на концентрацията на изпитваното вещество в седимента по време на фазата на поглъщане, и за да се избегне намаляване на концентрацията на разтворения кислород. Избраната скорост на зареждане следва също да съответства на естествено срещащи се стойности на гъстотата на популациите на избраните видове (43). Например, за *Tubifex tubifex* се препоръчва скорост на зареждане от 1 до 4 mg тъкан от червей (мокро тегло) на всеки грам влажен седимент (8) (11). В позовавания (1) и (6) за *L. variegatus* се препоръчва скорост на зареждане ≤ 1 g сухо тегло на тъкан от червей на 50 g органичен въглерод в седимента.
43. Червеите, които трябва да се използват при дадено изпитване, се отстраняват от културата чрез пресяване на седимента от културата. Животните (полово зрели или големи червей, които не показват признаци на неотдавнашно разкъсване) се прехвърлят в стъклени блюда (напр. блюда на Петри), съдържащи чиста вода. Ако условията на изпитването се различават от условията на отглеждане, фаза на аклиматизация от 24 h следва да е достатъчна. Преди претеглянето следва да се отстрани излишната вода от червеите. Това може да се извърши чрез внимателно поставяне на червеите върху предварително навлажнена хартия тип тишу. Не се препоръчва да се използва абсорбираща хартия за подсушаване на червеите, тъй като това може да причини стрес или увреждане на червеите. Brunson et al. (1998) препоръчва използване на червей, при които не е приложено попиване, с биомаса, приблизително равна на 1,33 пъти целевата биомаса. Тези допълнителни 33 % съответстват на разликата между червеите, при които е приложено попиване, и тези, при които не е приложено (28).
44. В началото на фазата на поглъщане (ден 0 от изпитването) изпитваните организми се отстраняват от камерата за аклиматизация и се разпределят на случаен принцип в съдове (напр. блюда на Петри), съдържащи възстановена вода, чрез добавяне на групи от по два червея във всеки съд, докато във всеки съд се съберат 10 червея. Всяка от тези групи от червей след това се прехвърля на случаен принцип в отделни съдове за изпитване, например с помощта на меки стоманени пинсети. Съдовете, в които се извършва изпитването, впоследствие се инкубират при условията на изпитването.

Хранене

45. С оглед на ниското съдържание на хранителни вещества в изкуствения седимент, седиментът трябва да бъде допълнен с източник на храна. За да не се подцени експозицията на изпитваните организми, например чрез селективно хранене с незамърсени храни, храната, необходима за размножаването и растежа на изпитваните организми, следва да бъде прибавена към седимента веднъж преди или по време на прилагането на изпитваното вещество (вж. приложение 5).

Съотношение седимент-вода

46. Препоръчителното съотношение седимент-вода е 1:4 (45). Това съотношение се считат за подходящо за поддържане на подходящи нива на концентрацията на кислород, и с оглед избягване на натрупването на амоняк във водата над седимента. Съдържанието на кислород във водата над седимента следва да се поддържа на ≥ 40 % от стойността на насищане. Водата над седимента в съдовете за изпитване следва леко да се аерира (напр. 2-4 мехурчета в секунда) с помощта на пипета „Пас-тьор“, разположена на приблизително 2 cm над повърхността на седимента, за да се ограничи максимално нарушаването на седимента.

▼ M6**Светлина и температура**

47. Продължителността на излагане на светлина в културата и при изпитването е 16 часа (1) (6). Светлинният интензитет в зоната на изпитването следва да се поддържа на около 500-1 000 lx. Температурата трябва да бъде 20 ± 2 °C по време на цялото изпитване.

Концентрации на изпитване

48. Една изпитвана концентрация (възможно най-ниска) се използва за определяне на кинетиката на поглъщане, но може да се използва втора (по-висока) концентрация (напр. (46)). В този случай пробите се вземат и анализират в стационарно състояние или след 28 дни за потвърждаване на BAF, измерена при по-ниската концентрация (11). По-високата концентрация следва да се избере така, че неблагоприятните последици да могат да бъдат изключени (например чрез избирането на приблизително 1 % от най-ниската известна концентрация с хронично въздействие EC_{x_1} , изведена при съответните изследвания за хронична токсичност). По-ниската изпитвана концентрация трябва да е значително по-висока от границата на откриване в седимент и в биологични проби за използвания метод за анализ. Ако ефективната концентрация на изпитваното вещество е близка до границата на откриване за използвания метод за анализ, препоръчва се използването на изотопно белязано изпитвано вещество с висока специфична радиоактивност.

Третиранни и контролни повторения

49. Минималният брой на третираните повторения за измервания на кинетиката следва да бъде три на точка за пробовземане (11) по време на фазите на поглъщане и на елиминиране. Следва да се използват допълнителни повторения, напр. за незадължителни допълнителни дати за вземане на проби. За фазата на елиминиране се приготвя съответен брой повторения със седимент, в който не е добавено изпитвано вещество, и с вода над седимента, така че третираните червеи да могат да бъдат прехвърлени от определените съдове с третиране в съдове без третиране в края на фазата на поглъщане. Общият брой на третираните повторения трябва да бъде достатъчен както за фазата на поглъщане, така и за фазата на елиминиране.
50. Като алтернатива, червеите, определени за вземане на проби по време на фазата на елиминирането, могат да бъде експонирани в един голям контейнер, който съдържа седимент с добавено изпитвано вещество от същата партида, която е използвана за кинетиката на усвояването. Трябва да се докаже, че условията за изпитването (напр. дълбочина на седимента, съотношение седимент-вода, зареждане, температура, качество на водата), са сравними с тези в повторенията, определени за фазата на поглъщане. В края на фазата на поглъщане водата, седиментът и пробите с червеи следва да бъдат взети от този контейнер за анализ, и достатъчно на брой големи червеи, които не показват никакви признаци на неотдавнашно разкъсване, трябва да се отстранят внимателно и да се прехвърлят към повторенията, подготвени за фазата на елиминиране (напр. десет организма за един съд с повторение).
51. Ако се използва разтворител, различен от вода, за биологичен анализ и за анализ на фона следва да бъдат приготвени поне 9 повторения с отрицателни контроли (най-малко 3 пробовзети в началото, 3 в края на фазата на поглъщане и 3 в края на фазата на елиминиране). Ако за прилагането на изпитваното вещество е използвано някакво средство за повишаване на разтворимостта, следва да бъде проведено изпитване на контрола на разтворител (най-малко 3 повторения се пробовземат в началото, 3 в края на фазата на поглъщане и 3 в края на фазата на елиминиране). В този случай най-малко 4 повторения с отрицателна контрола (без разтворител) следва да бъдат приготвени за вземане на проби в края на фазата на поглъщане. Тези повторения може да се сравнят биологично с контролата на разтворител, за да се добие информация за възможното влияние на разтворителя върху изпитваните организми. По-подробна информация е посочена в допълнение 3.

▼ **M6****Честота на измерванията на качеството на водата**

52. Като минимум трябва да се измерят следните параметри за качество на водата във водата над седимента по време на фазата на поглъщане и на елиминиране:

Температура	в един съд от всяко ниво на третиране на всяка дата на пробовземане и в един съд с контрола веднъж седмично и в началото и в края на периодите на поглъщане и на елиминиране; температурата на заобикалящата среда (въздух от околната среда или водна баня) или в представителен съд за изпитване може също така да бъде записвана, например непрекъснато или на интервали от един час;
Съдържание на разтворения кислород	в един съд на всяко ниво на третиране, и в един съд с контрола на всяка дата на пробовземане; изразен като mg/l и % ASV (стойност на насищане при равновесие с атмосферния въздух);
Подаване на въздух	контролирано поне веднъж на ден (работни дни) и коригирано, ако е необходимо;
pH	в един съд с третиране от всяко ниво на третиране на всяка дата на пробовземане и в един съд с контрола веднъж седмично и в началото и в края на периодите на поглъщане и на елиминиране;
Обща твърдост на водата	поне в един съд с третиране и в един съд с контрола в началото и в края на периодите на поглъщане и на елиминиране, изразена като mg/l CaCO ₃ ;
Общо съдържание на амоняк	поне в един съд с третиране и в един съд с контрола в началото и в края на периодите на поглъщане и на елиминиране; изразено като mg/l NH ₄ ⁺ или NH ₃ или общо азот от амоняк.

Пробовземане и анализ на червен, седимент и вода*График за пробовземане*

53. В допълнение 3 са дадени примери за графици за вземане на проби при фаза на поглъщане с продължителност 28 дни и при фаза на елиминиране с продължителност 10 дни.
54. Пробовзема се от водата и седимента от изпитвателните камери за определяне на концентрацията на изпитваното вещество преди добавянето на червеите и по време както на фазата на поглъщане, така и на фазата на елиминиране. По време на изпитването концентрациите на изпитваното вещество се определят в червеите, седимента и водата, за да може да се наблюдава разпределението на изпитваното вещество в подразделенията на изпитваната система.
55. Пробовзема се от червеите, седимента и водата най-малко шест пъти по време на фазата на поглъщане, както и на фазата на елиминиране.
56. Пробовземането продължава до достигане на плато (стационарно състояние) (вж. допълнение 1) или в продължение на 28 дни. Ако платото не е достигнато в рамките на 28 дни, започва се фазата на елиминиране. При започването на фазата на елиминиране определените червеи се прехвърлят в камери с повторения, съдържащи нетретирани седимент и вода (вж. също точки 17 и 18).

Пробовземане и приготвяне на пробите

57. Пробите на водата се получават чрез декантиране, изпомпване или пипетиране на обем, достатъчен за измерване на количеството на изпитваното вещество в пробата.
58. Останалата над седимента вода внимателно се декантира или изпомпва от изпитвателната камера (или камери). Пробите от седимента трябва да се вземат внимателно, така че да се причинява минимално смущаване на червеите.

▼ **M6**

59. По време на пробовземане всички червеи се отстраняват от изпитваното повторение, напр. чрез суспендиране на седимента с водата над него и разпростиране на съдържанието на всяко повторение в плитка табла и хващане на червеите с помощта на меки стоманени пинсети. Те се изплакват за кратко време с вода в плитка стъклена или стоманена табла. Излишната вода се отстранява. Червеите внимателно се прехвърлят в предварително претеглен съд и се претеглят. Червеите се умъртвяват чрез замразяване (напр. ≤ -18 °C). Наличието и броят на пашкулите и/или ювенилните екземпляри трябва да бъдат записани.
60. Като цяло, червеите следва да се претеглят и умъртвяват непосредствено след пробовземането и се изваждат веднага след вземането на пробата без фаза на изхвърляне на чревното съдържимо, за да се получи консервативна стойност за VAF, която включва контаминирано чревно съдържание, и за да се избегне загубата на остатъци в организма по време на всяко изхвърляне на чревното съдържимо само във вода (8). Вещества с $\log K_{ow}$ над 5 не се очаква да бъдат елиминирани в значима степен през никой от периодите на изхвърляне на чревното съдържимо само във вода, докато вещества със стойност на $\log K_{ow}$ по-ниска от 4 могат да се загубят в забележими количества (47).
61. По време на фазата на елиминиране червеите изхвърлят чревното съдържимо в чист седимент. Това означава, че измерванията непосредствено преди фазата на елиминиране включват контаминиран с чревното съдържимо седимент, докато след първите 4-24 h от фазата на елиминиране се допуска, че по-голямата част от съдържанието, контаминирано с чревно съдържимо, е заменено с чист седимент (11) (47). Концентрацията в червеите от тази проба тогава може да се смята за концентрация в тъканите след изхвърляне на чревното съдържимо. За да се вземе предвид разреждането на концентрацията на изпитваното вещество от незамърсен седимент по време на фазата на елиминиране, теглото на чревното съдържимо може да се оцени от съотношенията мокро тегло/тегло на пепелта на червеите или сухо тегло/тегло на пепелта на червеите.
62. Ако целта на конкретно проучване е измерването на бионаличността и действителните тъканни остатъци в изпитваните организми, то поне подпроба от третирани животни (напр. от три допълнителни съда за повторения), за предпочитане пробовзети при достигнато стационарно състояние, трябва да бъдат претеглени, оставени да изхвърлят чревното съдържимо в чиста вода за период от 6 часа (47), и претеглени отново преди извършването на анализа. След това данните за теглото на червеите и концентрацията в тяхлото при тази подпроба могат да бъдат сравнени със стойностите, получени от червеи, които не са били оставени да изхвърлят чревното съдържимо. Червеите, определени за измерване на елиминирането, не трябва да се оставят да изхвърлят чревното съдържимо преди прехвърлянето в чист седимент, с оглед свеждане до минимум на допълнителния стрес за животните.
63. Желателно е водата, седиментът и пробите с червеи да се анализират незабавно (т.е., в рамките на 1—2 дни) след отстраняването, с цел да се избегне разграждане или други загуби, и да се изчислят приблизителните скорости на поглъщане и елиминиране, докато продължава изпитването. Незабавните анализи също така избягват закъснението при определяне на достигането на плато.
64. Ако не се извършат незабавни анализи, пробите следва да се съхраняват при подходящи условия. Информацията относно стабилността и правилните условия за съхранение на конкретното изпитвано вещество се получава преди започването на изследването (напр. продължителност и температура на съхранение, процедури за екстракция и др.). Ако такава информация не е налична и е преценена за необходима, едновременно могат да бъдат проведени опити с контролни тъкани с добавка за определяне на стабилността при съхранение.

Качество на метода за анализ

65. Понеже цялата процедура се обуславя по същество от точността, прецизността и чувствителността на метода за анализ, използван за изпитваното вещество, следва да се провери опитно дали прецизността и възпроизводимостта на химичния анализ, както и на аналитичния добив на изпитваното вещество от водата, седимента и пробите от

▼ **M6**

червеите са задоволителни за конкретния метод. Следва да се провери също така дали изпитваното вещество не е откриваемо в камерите с контролите в концентрации, които са по-високи от фоновите. Ако е необходимо, стойностите на C_w , C_s и C_a се коригират със стойностите на аналитичния добив и фоновите стойности в контролите. По време на изпитването 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 изпитваното вещество от устройството за пробовземане).

66. Общият аналитичен добив и аналитичният добив на изпитваното вещество от червеите, седимента, водата, и ако са използвани, от уловителите, съдържащи абсорбенти за улавяне на изпареното изпитвано вещество, следва да се запишат и протоколират.
67. Тъй като използването на изотопно белязани вещества се препоръчва, може да се анализира общата радиоактивност (т.е., базово вещество и продукти от разграждането му). Ако обаче е осъществимо при анализа, количественото определяне на базовото вещество и на продуктите от разграждането му в стационарно състояние или в края на фазата на поглъщането, може да предостави важна информация. Ако се възнамерява извършване на такива измервания, след това пробите трябва да бъдат подложени на подходящи процедури за екстракция, така че базовото вещество да може да бъде количествено определено отделно. Когато бъде открит продукт от разграждане, представляващ значим процент (напр. > 10 %) от радиоактивността, измервана в изпитваните организми при стационарно състояние или в края на фазата на поглъщане, препоръчва се този продукт от разграждане да бъде идентифициран (5).
68. Поради ниската стойност на индивидуалната биомаса, често не е възможно да се определи концентрацията на изпитваното вещество във всеки отделен червей, освен в случаите, когато като вид за изпитване се използва *Branchiura sowerbyi* (40-50 mg мокро тегло на червей) (11). Поради това обединяването на индивиди, пробовзети от даден изпитвателен съд, се допуска, но това ограничава статистическите процедури, които могат да се приложат към данните. Ако дадена специфична статистическа процедура и мощност представляват важни съображения, тогава в изпитването следва да се включат достатъчен брой изпитвани животни и/или изпитвателни камери с повторения, които да съответстват на желаните обединяване, процедура и мощност (6)(7).
69. Препоръчва се BAF да се изразява като функция както от общото мокро тегло, така и от общото сухо тегло и, когато се изисква (т.е., за силно липофилни вещества), като функция от съдържанието на липиди и на ТОС в седимента. За определянето на съдържанието на липиди следва да се използват подходящи методи (48)(49). Техниката за екстракция с хлороформ/метанол (50) може да се препоръча като стандартен метод (48). За да се избегне употребата на хлорирани разтворители обаче, може да се използва изпитана при кръгово изпитване модификация на метода на Bligh и Dyer (50), описана в (51). Тъй като различните методи не дават идентични стойности (48), важно е да се дадат подробности за използвания метод. Когато е възможно, т.е., ако е налице достатъчно тъкан от червеи, съдържанието на липиди се измерва в същата проба или същия екстракт като използвания за анализа за изпитваното вещество, понеже липидите често трябва да се отстраняват от екстракта, преди той да бъде анализиран хроматографски (5). Независимо от това е практично да се използват аклиматизирани контролни животни най-малко в началото или — за предпочитане — в края на фазата на поглъщане, за измерване на съдържанието на липиди, например в три проби.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Обработка на резултатите**

70. Кривата на поглъщането на изпитваното вещество се получава чрез начертаване върху аритметична скала на неговата концентрация

▼ **M6**

във/върху червеите във фазата на поглъщането спрямо времето. Ако кривата достигне до плато, следва да се изчисли стационарно състояние BAF_{ss} :

$$\frac{C_a \text{ при стационарно състояние в ден 28 (средно)}}{C_s \text{ при стационарно състояние в ден 28 (средно)}}$$

71. Определя се кинетичният коефициент на биоаккумуляция (BAFK) като съотношението ks/ke . Константата на скоростта на елиминиране (ke) обикновено се определя чрез кривата на елиминиране (т.е., графика на концентрацията на изпитваното вещество в червеите по време на фазата на елиминирането). След това константата на скоростта на поглъщане ks се изчислява от кинетиката на кривата на поглъщането. Предпочитаният метод за получаване на BAFK и константите за скорост ks и ke , е да се използват нелинейни методи за оценка на параметри с помощта на компютър (виж допълнение 2). Ако е очевидно, че към елиминирането не може да се приложи кинетика от първи порядък, следва да се използват по-сложни модели (25)(27)(52).
72. Коефициентът на акумулация биота-седимент (BSAF) се определя чрез нормализиране на BAFK за липидното съдържание на червеите и общото съдържание на органичен въглерод на седимента.

Интерпретиране на резултатите

73. Резултатите трябва да се интерпретират с внимание, когато измерените концентрации на изпитване са на равнища, близки до границата на откриване на използвания метод за анализ.
74. Ясно определените криви на поглъщане и на елиминиране са показател за данни за биоаккумуляцията, които са с добро качество. Обикновено доверителните граници за стойностите на BAF при добре планирани проучвания не трябва да надвишават 25 % (5).

Протокол от изпитването

75. Протоколът от изпитването трябва да включва следната информация:

Изпитвано вещество

- физична природа и физични и химични свойства — напр. $\log K_{ow}$, разтворимост във вода;
- данни за неговата химична идентификация; източник на изпитваното вещество, идентичност и концентрация на използвания разтворител, ако има такъв;
- ако е изотопно белязано — точно положение на белязаните атом, специфичната радиоактивност и процентът на радиоактивността, свързан с очистианията.

Животински видове за изпитването

- научно наименование, шам, източник, всякаква предварителна обработка, аклиматизация, възраст, размах на размерите и т.н.

Условия на изпитването

- използвана процедура на изпитване (напр. статична, полустатична или проточна);
- тип и характеристики на използваното осветление и фотопериода(ите),
- планиране на изпитването (например брой, материал и размер на камерите за изпитване, обем на водата, маса и обем на седимента, скорост на подмяна на обема вода (за проточна или полустатична процедури), всякакво аериране, използвано преди и по време на изпитването, брой на повторенията, брой червеи на повторение, брой на концентрациите на изпитване, продължителност на фазите на поглъщане и на елиминиране, честота на пробовземането);

▼ M6

- метод за приготвяне на изпитваното вещество и метод за прилагането му, както и обосновка за избора на конкретен метод;
- номиналните концентрации на изпитване;
- източник на съставките на изкуствената вода и седимент или — ако е използвана естествена среда — произход на водата и седимента, описание на предварителната подготовка, резултати от всички доказателства за способността на изпитваните животни за живот и/или размножаване в използваната среда, характеристики на седимента (рН и амониак във водата между частиците на седимента (естествени седименти), съдържание на органичен въглерод (ТОС), зърнометричен състав (процент на пясък, прах и глина) и процент на съдържание на вода, и всички други извършени измервания), и характеристики на водата (рН, твърдост, проводимост, температура, концентрация на разтворен кислород, остатъчни нива на хлор (ако се измерват) и всички други направени измервания);
- номиналното и измереното сухо тегло в % от мокрото тегло (или съотношение сухо тегло към мокро тегло) на изкуствения седимент; измереното сухо тегло в % от мокрото тегло (или съотношение сухо тегло към мокро тегло) на седименти в полеви условия;
- качество на водата в камерите за изпитване, характеризирано чрез температура, рН, твърдост, амониеви йони, обща твърдост и концентрация на разтворен кислород;
- подробна информация за третирането на пробите от водата, седимента и червеите, включително подробности за приготвяне, съхранение, процедури на добавяне, екстракция и процедури за анализ (и прецизност) за изпитваното вещество и съдържанието на липиди, както и аналитичен добив на изпитваното вещество.

Резултати

- смъртност на контролните червеи и на червеите във всяка изпитвателна камера и всякакви наблюдавани сублетални ефекти, включително необичайно поведение (напр. избягване на седимента, наличие или липса на фекални пелети, липса на размножаване);
- измереното сухо тегло в % от мокрото тегло (или съотношение сухо тегло към мокро тегло) на седимента и изпитваните организми (полезно за нормализацията);
- съдържанието на липиди в червеите;
- криви, показващи кинетиката на поглъщане и елиминиране на изпитваното вещество в червеите, както и времето за достигане до стационарно състояние;
- C_a , C_s и C_w (със стандартно отклонение и размах, ако е уместно) за всички времена на вземане на проби (C_a изразено в $g\ kg^{-1}$ мокро и сухо тегло на цялото тяло, C_s изразено в $g\ kg^{-1}$ мокро и сухо тегло на седимента, и C_w в $mg\ l^{-1}$). Ако се изисква коефициент на акумулация биота-седимент (BSAF; вж. допълнение 1 за определение) (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 (ОС) на седимента;
- BAF (изразено в kg мокро тегло на седимент kg^{-1} мокро тегло на червеи), константа на скоростта на поглъщане от седимента k_s (изразена в g мокро тегло на седимент g^{-1} мокро тегло на червеи d^{-1}), и константа на скоростта на елиминиране k_e (изразена в d^{-1}); BSAF (изразен в kg ОС в седимент kg^{-1} липидно съдържание на червеите) може да се протоколира допълнително;

▼ M6

- Неелиминирани остатъци (NER) в края на фазата на елиминиране;
- ако е измервано: проценти на базовото вещество, продукти от разграждането и свързани остатъци (т.е., процентът от изпитваното вещество, който не може да бъде екстрахиран с помощта на обичайните методи за екстракция), открити в изпитваните животни;
- Методи, използвани за статистически анализи на данните.

Оценка на резултатите

- съответствие на резултатите с критериите за валидност, изброени в точка 21;
- неочаквани или необичайни резултати, напр. непълно елиминиране на изпитваното вещество от изпитваните животни; в такива случаи резултатите от всички предварителни проучвания могат да представят полезна информация.

▼ **M6***Допълнение 1***Определения и мерни единици**

Изкуствен седимент или формулиран, възстановен или синтетичен седимент, е смес от материали, използвани за симулиране на физичните съставки на естествения седимент.

Биоаккумуляция е увеличаването на концентрацията на изпитваното вещество във или върху организъм, отнесено към концентрацията на изпитваното вещество в заобикалящата среда. Биоаккумуляцията настъпва в резултат на процесите на биоконцентрация и биомагнификация (вж. по-долу).

Коефициент на биоаккумуляция (BAF) по всяко време във фазата на поглъщане в настоящото изпитване за биоаккумуляция е концентрацията на изпитваното вещество във/върху изпитвания организъм (C_a в g kg^{-1} мокро или сухо тегло), разделена на концентрацията на веществото в заобикалящата среда (C_s като g kg^{-1} мокро или сухо тегло на седимент); За съответствие с мерните единици на C_a и C_s , BAF се измерва в $\text{kg седимент kg}^{-1}$ червеи (15).

Коефициентите на биоаккумуляция, изчислявани директно от съотношението, изразено чрез константата на скоростта на поглъщане от седимента, разделена на константите на скоростта на елиминиране (съответно k_s и k_e , вж. по-долу), се наричат **кинетичен коефициент на биоаккумуляция (BAF_K)**.

Биоконцентрация е увеличаването на концентрацията на изпитваното вещество във или върху организъм, което настъпва изцяло в резултат от поглъщане чрез повърхността на тялото, отнесено към концентрацията на изпитваното вещество в заобикалящата среда.

Биомагнификация е увеличаването на концентрацията на изпитваното вещество във или върху организъм, което настъпва в резултат главно на поглъщане от замърсени храна или плячка, отнесено към концентрацията на изпитваното вещество в храната или плячката. Биомагнификацията може да доведе до пренос или акумулация на изпитваното вещество в хранителните мрежи.

Коефициент на акумулация биота-седимент (BSAF) е нормализираната по отношение на липидите концентрация на изпитваното вещество във/върху изпитвания организъм при достигнато стационарно състояние, разделена на нормализираната по отношение на органичния въглерод концентрация на веществото в седимента при достигнато стационарно състояние. C_a се изразява в g kg^{-1} липидно съдържание на организма, а C_s като g kg^{-1} органично съдържание на седимента;

Периодът на кондициониране се използва за стабилизиране на микробния компонент на седимента и за отстраняване, например, на амонияк с произход от компоненти на седимента; той предшества добавянето на изпитваното вещество към седимента. Обикновено след кондиционирането водата над седимента се изхвърля.

Елиминиране на изпитваното вещество е загубата на това вещество от тъканите на изпитвания организъм благодарение на активни или пасивни процеси, което се получава независимо от наличието или липсата на изпитваното вещество в заобикалящата среда.

Фаза на елиминиране е времето, което следва след прехвърлянето на изпитваните организми от замърсена среда в среда, несъдържаща изпитваното вещество, през което време се изследва елиминирането (или нетната загуба) на веществото от изпитваните организми.

Константата на скоростта на елиминиране (k_e) е числена стойност, определяща скоростта на намаляване на концентрацията на изпитваното вещество във/върху изпитвания организъм, настъпващо след прехвърлянето на изпитваните организми от среда, съдържаща изпитваното вещество, в среда, несъдържаща веществото. k_e се изразява в d^{-1} .

▼ M6

Периодът за достигане на равновесие се използва, за да се даде възможност за разпределение на изпитваното вещество между твърдата фаза, водата между частиците на седимента и водата над седимента; той следва добавянето на изпитваното вещество към седимента и предшества добавянето на изпитваните организми.

Коефициентът на разпределение октанол-вода (K_{ow}) е съотношението на разтворимостта на веществото в *n*-октанол и вода при достигнато равновесие, понякога изразяван също като P_{ow} . Логаритъмът от K_{ow} ($\log K_{ow}$) се използва като указание на потенциала на веществото за биоаккумуляция във водни организми.

Коефициент на разпределение органичен въглерод-вода (K_{oc}) е съотношението между концентрацията на веществото във/върху съдържащата органичен въглерод част от седимента и концентрацията на веществото във вода при достигнато равновесие.

Вода над седимента е водата, намираща се над седимента в съда за изпитване.

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 във всеки период на пробовземане 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 вещества, които се поглъщат бавно, е подходящо интервалите да бъдат по седем дни (5).

Вода между частиците на седимента или интерстициална вода е водата, която заема пространството между частиците на седимента или на почвата.

Константата на скоростта на поглъщане от седимента (k_s) е числена стойност, определяща скоростта на нарастване на концентрацията на изпитваното вещество във/върху изпитвания организъм, настъпващо в резултат на поглъщане от фазата на седимента. k_s се изразява в g седимент kg_{-1} червеи d_{-1} .

Седимент с добавка е седимент, към който е добавено изпитваното вещество.

Коефициент на биоаккумуляция в стационарно състояние (BCF_{SS}) е BAF при достигнато стационарно състояние и не се променя значимо за дълъг период от време, като концентрацията на изпитваното вещество в заобикалящата среда (C_s като $g\ kg^{-1}$ мокро или сухо тегло на седимента) през този период е константа.

Фазата на поглъщане или експозиция е времето, през което изпитваните организми са експонирани на изпитваното вещество.

▼ **M6***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 на изпитваното вещество в опитния организъм, C_a , на концентрацията на изпитваното вещество в седимента, C_s , при стационарно състояние. Ако по време на фазата на поглъщане не е достигнато стационарно състояние, BAF се изчислява по същия начин за ден 28. Следва обаче да се отбележи дали BAF се основава на концентрациите при стационарно състояние, или не.

Предпочитаният начин за получаване на кинетичния коефициент на биоаккумуляция (BAF_K), константата на скоростта на поглъщане от седимента (k_s) и константата на скоростта на елиминиране (k_e) е да се използват нелинейни методи за оценка на параметри с помощта на компютър. Като се има предвид динамичният ред на средните коефициенти на акумулация (C_a , средни стойности на всяка дата на вземане на проба/ C_s , средни стойности на всяка дата на вземане на проба = AF) във фазата на поглъщането, основани на мокрото тегло на червеите и седимента, и уравнението на модела

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{k_e \times t}) \quad (\text{уравнение 1})$$

където $AF(t)$ е съотношението на концентрацията на изпитваното вещество в червеите и неговата концентрация в седимента във всеки даден момент във времето (t) от фазата на поглъщане, тези компютърни програми изчисляват стойностите на BAF_K , k_s и k_e .

Когато е достигнато стационарно състояние по време на фазата на поглъщане (т.е., $t = \infty$), уравнение 1 може да се сведе до:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \quad (\text{уравнение 2})$$

където

k_s = константа на скоростта на поглъщане в тъкани [g седимент kg^{-1} червеи d^{-1}]

k_e = константата на скоростта на елиминиране [d^{-1}]

Тогава $k_s/k_e \times C_s$ е приблизителна стойност на концентрацията на изпитваното вещество в тъканите на червеите при стационарно състояние ($C_{a,ss}$).

Коефициентът на акумулация биота-седимент (BSAF) трябва да се изчислява по следния начин:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

където f_{oc} е частта органичен въглерод в седимента, а f_{lip} е частта липиди в червеите, основана или на сухото, или на мокрото тегло.

Като се има предвид даден динамичен ред от стойности на концентрацията, кинетиката на елиминирането може да се моделира, като се използват следните уравнения на модели, както и нелинеен метод за оценка на параметрите, основан на компютърни изчисления.

Измерената средна стойност на остатъци в организма в края на фазата на поглъщане се препоръчва като отправна точка по подразбиране. Стойността, изчислена по модела/оценена от фазата на поглъщане, следва да се използва само ако например измерената стойност се отклонява значимо от изчисления по модела остатък в организма. Вж. също точка 50 за алтернативни дейности преди експозицията на червеи, предназначени за фазата на елиминиране; при този подход се смята, че пробите от тези предварително експонирани червеи в ден 0 от фазата на елиминиране дават реалистични стойности на остатъка в организма за започване на кинетиката на елиминирането.

▼ M6

Ако графиката на данните като функция от времето сочи постоянно експоненциално намаляване на концентрацията на изпитваното вещество в животните, за описване на развитието на елиминирането във времето може да се използва модел с един компартмент (уравнение 4).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad (\text{уравнение 3})$$

Процесите на елиминиране понякога изглеждат двуфазови, с бързо намаляване на C_a през ранните фази, което в по-късните фази на елиминирането се променя към по-бавна загуба на изпитвани вещества (8)(19)(25). Двете фази могат да се тълкуват чрез допускането, че в организма има два компартмента, от които изпитваното вещество се елиминира с различна скорост. В такива случаи следва да се проучи специализираната литература, напр. (15) (16) (17) (25).

Елиминирането чрез два компартмента е описано напр. чрез следното уравнение (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \quad (\text{уравнение 4})$$

A и B представляват размерите на компартментите (в % от общия тъканен остатък), където A е компартментът с бързата загуба на вещество, а B е компартментът с бавна загуба на изпитвано вещество. Сумата от A и B е равна на 100 % от общия обем на компартментите на животното при стационарно състояние. k_a и k_b представляват съответните константи на елиминиране [d^{-1}]. Ако моделът с два компартмента бъде изгладен с данните от елиминирането, константата на скоростта на поглъщане k_s може да бъде определена както следва (53) (54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \quad (\text{уравнение 5})$$

Независимо от това, тези уравнения на модели следва да се използват внимателно, по-специално когато по време на изпитването се променя бионаличността на изпитваното вещество (42).

Като алтернатива на уравненията на моделите, посочени по-горе, кинетиката (k_s и k_e) може да се изчисли наведнъж, като се приложи моделът с кинетика от първи порядък едновременно към всички данни — към тези от фазата на поглъщане и към тези от фазата на елиминиране. За описание на метод, който може да позволи подобно комбинирано изчисляване на константите на скоростта на поглъщане и елиминиране, могат да бъдат консултирани източници (55), (56) и (57).

Неелиминирани остатъци (NER) следва да се изчисляват като вторична крайна точка чрез умножаване по 100 на отношението на средната стойност на концентрацията в червеите (C_a) в ден 10 от фазата на елиминиране и средната стойност на концентрацията в червеите (C_a) при стационарно състояние (ден 28 от фазата на поглъщане):

$$NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ at the end of elimination (average)} \times 100}{C_a \text{ at steady state (average)}}$$

▼ **M6**

Допълнение 3

Примерен график за пробовземане за 28-дневно изпитване на биоаккумуляция

а) Фаза на поглъщане (включително 4-дневна фаза на уравнивяване)

Ден	Дейности
– 6	Подготовка на торфена суспензия за седимент; кондициониране на суспензията в продължение на 48 h;
– 4	Добавяне на седимент или фракция от седимент; смесване на всички съставки на седимента; отстраняване на пробите от третирания седимент и от седимента в контролата на разтворител, за определяне на концентрацията на изпитваното вещество; добавяне на водата над седимента; инкубиране при условията на изпитването (фаза на уравнивяване);
– 3/– 2	Отделяне на изпитваните организми от културата за аклиматизиране;
0	Измерване на качеството на водата (вж. точка 52); отстраняване на повторенията за вземане на проби от вода и седимент за определяне на концентрацията на изпитваното вещество; разпределение на червеите в изпитвателните камери на случаен принцип; отделяне на достатъчно подпроби от червеи за аналитично определяне на фоновите стойности; проверка на подаването на въздух, ако се използва затворена система;
1	Отстраняване на повторенията за вземане на проби; проверка на подаването на въздух, на поведението на червеите, качеството на водата (вж. точка 56); вземане на проби вода, седимент и червеи за определяне на концентрация на изпитваното вещество;
2	Проверка на подаването на въздух, на поведението на червеите и на стойността на температурата;
3	Същото като ден 1;
4 — 6	Същото като ден 2;
7	Същото като ден 1; компенсиране на загубите на вода от изпаряване, ако е необходимо;
8 — 13	Същото като ден 2;
14	Същото като ден 1; компенсиране на загубите на вода от изпаряване, ако е необходимо;
15 — 20	Същото като ден 2;
21	Същото като ден 1; компенсиране на загубите на вода от изпаряване, ако е необходимо;
22 — 27	Същото като ден 2;
28	Същото като ден 1; измерване на качеството на водата (вж. точка 52); край на фазата на поглъщане; отделяне на достатъчно количество подпроби червеи за аналитично определяне на фоновите стойности, на мокрото и сухото тегло и на съдържанието на липиди; прехвърляне на червеите от оставащите подложени на експозиция повторения в съдове с чист седимент за фазата на елиминиране (без изхвърляне на чревното съдържимо); вземане на проби от вода, седимент и червеи от контролите на разтворител. пробовземане от разтворите за улавяне, ако има такива.
	Дейностите преди експозицията (фаза на уравнивяване) следва да се планират, като се вземат предвид свойствата на изпитваното вещество. Ако е необходимо, приготвеният седимент се кондиционира под водата над седимента при температура 20 ± 2 °C в продължение на 7 дни; в този случай — по-ранно приготвяне на седимента!
	Дейностите, описани за ден 2, следва да се извършват ежедневно (най-малкото в работни дни).

▼ **M6****б) Фаза на елиминиране**

Ден	Дейности
– 6	Подготовка на торфена суспензия за седимент; кондициониране на суспензията в продължение на 48 h;
– 4	смесване на всички съставки на седимента; отстраняване на пробите от третирания седимент и от седимента в контролата на разтворител, за определяне на концентрацията на изпитваното вещество; добавяне на водата над седимента; инкубиране при условията на изпитването;
0 (ден 28 от фазата на поглъщане)	Измерване на качеството на водата (вж. точка 52); прехвърляне на червеите от оставащите подложки на експозиция повторения в съдове с чист седимент; след 4 — 6 h отстраняване на повторенията за вземане на проби от вода, седимент и червеи за определяне на концентрацията на изпитваното вещество; разпределение на червеите в изпитвателните камери на случаен принцип;
1	Отстраняване на повторенията за вземане на проби; проверка на подаването на въздух, на поведението на червеите, качеството на водата (вж. точка 52); вземане на проби вода, седимент и червеи за определяне на концентрацията на изпитваното вещество;
2	Проверка на подаването на въздух, на поведението на червеите и на стойността на температурата;
3	Същото като ден 1;
4	Същото като ден 2;
5	Същото като ден 1;
6	Същото като ден 2;
7	Същото като ден 1; компенсиране на загубите на вода от изпаряване, ако е необходимо;
8 — 9	Същото като ден 2;
10	Същото като ден 1; край на фазата на елиминиране; измерване на качеството на водата (вж. точка 52); вземане на проби от вода, седимент и червеи от контролите на разтворител; пробоземане от разтворите за улавяне, ако има такива.
	Приготвянето на седимента преди началото на фазата на елиминиране се извършва по същия начин, по който се извършва преди фазата на поглъщане.
	Дейностите, описани за ден 2, следва да се извършват ежедневно (най-малкото в работни дни).

▼ **M6**

Допълнение 4

Някои физични и химични характеристики на приемлива вода за разреждане

СЪСТАВКА	КОНЦЕНТРАЦИИ
Твърди частици	< 20 mg/l
Общ органичен въглерод	< 2 µg/l
Нейонизиран амоняк	< 1 µg/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

СЪСТАВ НА ПРЕПОРЪЧАНАТА ВЪЗСТАНОВЕНА ВОДА

а) Разтвор от калциев хлорид

В дейонизирана вода се разтварят 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; допълва се до 1 l с дейонизирана вода

б) Разтвор на магнезиев сулфат

В дейонизирана вода се разтварят 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; допълва се до 1 l с дейонизирана вода

в) Разтвор на натриев бикарбонат

В дейонизирана вода се разтварят 2,59 g NaHCO_3 ; допълва се до 1 l с дейонизирана вода

г) Разтвор на калиев хлорид

В дейонизирана вода се разтварят 0,23 g KCl ; допълва се до 1 l с дейонизирана вода

Всички химикали следва да са с квалификация „чист“.

Проводимостта на дестилираната или дейонизираната вода не следва да надвишава $10 \mu\text{Scm}^{-1}$.

25 ml от всеки от разтвори а)—г) се смесват и общият обем се допълва до 1 литър с дейонизирана вода. Сборът от калциевите и магнезиевите йони в този разтвор е 2,5 mmol/l.

Съотношението на Ca:Mg йони е 4:1, а на Na:K йони — 10:1. Алкалността на този разтвор до достигане на pH 4,3 ($K_{S4,3}$) е 0,8 mmol/l.

Водата за разреждане се аерира до насищане с кислород, след това се съхранява около два дни без допълнително аериране преди употреба.

Стойността на pH на приемлива вода за разреждане следва да бъде в интервала от 6 до 9.

▼ M6

Допълнение 5

Изкуствен седимент — препоръки за приготвяне и съхранение

За разлика от изискванията в метод за изпитване В.8 (40), за съдържанието на торф в изкуствения седимент се препоръчва стойност 2 % вместо 10 % от сухото тегло, за да съответства на ниските до умерени стойности на съдържанието на органична материя в естествените седименти (58).

Процентно съдържание на сухите съставки на изкуствения седимент:

Съставка	Характеристики	% от сухия седимент
Торф	Торф от торфен мъх, степен на разграждане: „средна“, изсушен на въздух, без видими остатъци от растения, фино смлян (размер на частиците $\leq 0,5$ mm)	$2 \pm 0,5$
Кварцов пясък	Размер на зърната: ≤ 2 mm, но > 50 % от частиците следва да бъдат в диапазон 50—200 μ m	76
Каолин	Съдържание на каолинит ≤ 30 %	22 ± 1
Източник на храна	<i>Folia urticae</i> , стрити на прах листа от <i>Urtica</i> sp. (коприва), фино смляни (размер на частиците $\leq 0,5$ mm), или смес от стрити на прах листа от <i>Urtica</i> sp. с алфа-целулоза, (1: 1); в съответствие с аптечните стандарти, за консумация от човека; в допълнение към сухия седимент	0,4 — 0,5 %
Калциев карбонат	CaCO ₃ , на прах, химически чист, в допълнение към сухия седимент	0,05 — 1
Дейонизирана вода	Проводимост ≤ 10 μ S/cm, в допълнение към сухия седимент	30 — 50

Ако се очакват повишени концентрации на амониак, например ако за изпитваното вещество е известно, че потиска нитрификацията, може да се окаже полезно 50 % от богатия на азот прах от *Urtica* да се заменят с целулоза (напр. α -целулоза на прах, химически чиста, размер на частиците $\leq 0,5$ mm;

Приготвяне

Торфът се изсушава на въздух и се смля на фин прах (размер на частиците $\leq 0,5$ mm, без видими остатъци от растения). Приготвя се суспензия от изискваното количество торф на прах, като се използва част от дейонизираната вода, която ще се добави към сухия седимент (установено е, че воден обем от $11,5 \times$ сухото тегло на торфа е полезен за приготвяне на торфена каша, която може да бъде разбърквана (8)), като се използва високоскоростно хомогенизиращо устройство.

Стойността на рН на тази суспензия се коригира до $5,5 \pm 0,5$ с CaCO₃. Суспензията се аклиматизира най-малко два дни при 20 ± 2 °C, като се разбърква леко, за да се стабилизира рН и да се установи стабилна микробна съставка. Измерва се отново рН и, ако е необходимо, се коригира до $6,0 \pm 0,5$ с CaCO₃. След това цялата суспензия се смесва с другите сухи съставки, като се взема под внимание всяка част, използвана за добавка. Останалата дейонизирана вода се добавя, за да се получи хомогенен седимент. Измерва се отново рН и, ако е необходимо, се коригира от $6,5$ до $7,5$ с CaCO₃. Независимо от това, ако се очаква изменение в стойностите на амониак, може да бъде полезно рН на седимента да се поддържа под 7,0 (например между 6,0 и 6,5). Вземат се проби от седимента, за да се определи сухото тегло и съдържанието на органичен въглерод. Ако се очаква изменение в стойностите на амониак, изкуственият седимент може да бъде кондициониран в продължение на седем дни при същите условия, които преобладават в последващото изпитване (напр. съотношение седимент—вода от 1: 4, височина на слоя седимент както в съдовете за изпитване), преди към него да бъде добавено изпитваното вещество, т.е., следва към него да бъде допълнена вода, която трябва да е аерирана. В края на периода за кондициониране водата над седимента следва да се отстрани и изхвърли. Вземат се проби от седимента, за да се определи сухото тегло и общото съдържание на органичен въглерод (напр. 3 проби).

▼ M6

След това кварцовият пясък с добавка се смесва със седимента за всяко равнище на третиране, седиментът се разпределя по съдовете за повторенията и се залива с водата за изпитването (напр. съотношение седимент—вода от 1: 4, височина на слоя седимент както в съдовете за изпитване). След това съдовете се инкубират при същите условия, които преобладават в последващото изпитване. Оттук започва периодът на достигане на равновесие. Водата над седимента следва да бъде аерирана.

Избраният източник на храна следва да се добави преди или по време на добавянето на изпитваното вещество към седимента. Тя може първоначално да се смеси с торфената суспензия (вж. по-горе). Независимо от това, прекомерното разграждане на източника на храна преди да бъдат добавени изпитваните организми — например в случай на дълго време за достигане на равновесие — може да се избегне чрез поддържане на максимално кратък времеви интервал между добавянето на храната и началото на експозицията. За да се гарантира, че храната е в достатъчен контакт с изпитваното вещество, източникът на храна следва да бъде смесен със седимента не по-късно от деня, в който изпитваното вещество се добавя към седимента. Могат да се направят изключения, когато продължителността на периода за уравнивяване води до прекомерно микробно разграждане на храната преди добавянето на изпитваните организми. Вземат се проби от седимента, за да се определи сухото тегло и общото съдържание на органичен въглерод (напр. 3 проби от седимент с добавка или седимент от контрола).

Сухото тегло на компонентите (торф, пясък, каолин) следва да се протоколира в g и в % от общото сухо тегло.

Обемът на водата за добавяне към сухите компоненти по време на приготвянето на седимента следва също да бъде протоколиран в % от общото сухо тегло (например 100 % сухо тегло + 46 % вода означава, че към 1 000 g сухо тегло се добавя общо 460 ml вода, което води до получаване на 1 460 g мокър седимент).

Съхранение

Сухите съставки на изкуствения седимент могат да се съхраняват в сухо и хладно място при стайна температура. Пригответият мокър седимент може да се съхранява (за по-нататъшно използване само в култури) при 4 ± 2 °C на тъмно в продължение 2 до 4 седмици от деня на приготвянето (8).

Седиментът с добавено изпитваното вещество следва да се използва незабавно, освен ако има информация, че конкретният седимент може да се съхранява, без да се наруши токсичността или бионаличността на изпитваното вещество. До анализа пробите от седимент с добавено изпитвано вещество могат да се съхраняват при условията, препоръчани за конкретното изпитвано вещество.

▼ M6

Допълнение 6

Видове олигохети, препоръчвани за изпитването за биоаккумуляция

Tubifex tubifex (Müller), Tubificidae, Oligochaeta

Олигохетите от вида *Tubifex tubifex* (Müller) са представители на семейство Tubificidae (Tubificidae, Oligochaeta), обитават сладководните седименти, живеят в тръбички, обвити отвътре със слуз. В тези тръбички червеите живеят с главата надолу, поглъщайки частици от седимента, като усвояват съответните микроорганизми и органични отпадъци. Задната част обикновено извършва вълнообразни движения в надстоящата вода с цел дишане. Въпреки че този вид обитава широка гама от видове седименти навсякъде в северното полукълбо, *Tubifex tubifex* предпочита субстрат с относително фини частици (59). Пригодността на този вид за екотоксикологични изпитвания е описана например в (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63).

Методи за отглеждане

С цел да се разполага с достатъчен брой *Tubifex tubifex* за провеждане на изпитвания за биоаккумуляция, червеите трябва да се държат като постоянни едновидови култури, отглеждани в лабораторни условия. За отглеждане на *T. tubifex* се препоръчва система, състояща се от изкуствен седимент на основата на изкуствената почва в съответствие с метод за изпитване В.8 (40) и възстановена вода съгласно метод за изпитване В.1 (8).

Като съдове за отглеждане могат да се използват контейнери от стъкло или неръждаема стомана, с височина от 12 до 20 cm. Всеки контейнер за отглеждане се зарежда със слой от мокър изкуствен седимент, приготвен както е посочено в допълнение 5. Дълбочината на слоя седимент трябва да дава възможност за проявяване на естественото поведение на червеите (минимум 2 cm дълбочина за *T. tubifex*). Към системата се добавя възстановена вода. Трябва да се внимава за минимално нарушаване на седимента. Водното тяло леко се аерира (напр. 2 мехурчета в секунда с въздух, филтруван през 0,45 µm) с помощта на пипета „Пастър“, разположена на 2 cm над повърхността на седимента. Препоръчителната температура на културата е 20 ± 2 °C.

Червеите се добавят към системата с културата с максимално зареждане от 20 000 екземпляра/m² площ на седимента. По-голямо зареждане може да предизвика спад в процентите на растежа и размножаването (43).

В културите с изкуствен седимент червеите следва да бъдат хранени. Хранителен режим, съставен от фино смяна храна за риби, напр. TetraMin® може да служи като допълнително хранене (8); Klerks 1994, лично съобщение. Скоростите на подаване на храната трябва да дават възможност за достатъчен растеж и размножаване и следва да поддържат на минимално равнище натрупването на амоняк и развитието на гъбички в културата. Храна може да се дава два пъти седмично (например 0,6-0,8 mg на cm² от площта на седимента). Практическият опит е показал, че прилагането на храна, суспендирана и хомогенизирана в дейонизирана вода, може да улесни хомогенното разпределяне на храна върху площта на седимента в контейнерите с културата.

За да се избегне натрупване на амоняк, водата над седимента следва да се обменя, като се използва проточна система, или ръчно поне веднъж седмично. Седиментът в изходните култури трябва да се сменя на всеки три месеца.

Вземане на проби от червеи от културата може да бъде правено чрез прекарване на седимента с културата през сито с отвори 1 mm, ако са необходими само полово зрели екземпляри. За задържане на пашкулчетата е подходящ отвор от 0,5 mm мрежа, а за ювенилните екземпляри — отвор от 0,25 mm. Ситата могат да се поставят във възстановена вода, след като е преминал седиментът. Червеите напускат мрежата и след това могат да се съберат от водата с меки стоманени пиниети или пипета с ръбове с огнева полировка.

▼ M6

Само интактни и ясно идентифицирани образци от *Tubifex tubifex* (напр. (64)) се използват за започване на изпитването или за нови култури. Болните или ранени червеи, както и пашкулите, заразени с гъбни хифи, трябва да бъдат изхвърляни.

Дадена синхронизирана култура може да осигури червеи на определена възраст в подходящи интервали, когато са необходими. Нови съдове за отглеждане се приготвят в избраните интервали (например веднъж на всеки две седмици), като се започне с животни на определена възраст (напр. пашкули). При условията на отглеждане, описани тук, червеите достигат полово зрялост след 8-10 седмици. Клетъчните култури могат да се събират, когато червеите са отделили нови пашкули, напр. след десет седмици. Пробовзетите полово зрели екземпляри могат да се използват за изпитвания, а с пашкулчетата могат да се стартират нови култури.

***Lumbriculus variegatus* (Müller), Lumbriculidae, Oligochaeta**

Lumbriculus variegatus (Müller), Lumbriculidae, Oligochaeta също обитава сладководни седименти в целия свят и широко се използва при екотоксикологични изпитвания. Информация за биологичните особености, условията за отглеждане и чувствителност на видовете може да бъде получена от (1) (6) (9) (36). *Lumbriculus variegatus* също може да бъде отглеждан в изкуствения седимент, препоръчан за *T. tubifex* според (8), в рамките на определени ограничения. Тъй като в естествени условия *L. variegatus* предпочита седименти с по-едри частици, отколкото *T. tubifex* (59), отглеждането в лабораторни условия с изкуствения седимент, използван за *T. tubifex*, може да спре след 4 до 6 месеца. Практическият опит показва, че *L. variegatus* могат да бъдат държани в пясъчен субстрат (напр. кварцов пясък, фин чакъл) при проточна система, с използване на храна за риби като хранителен източник, в продължение на няколко години без подновяване на субстрата. Основно предимство на *L. variegatus* в сравнение с други видове водни олигохети е бързото му размножаване, водещо до бързо увеличаване на биомасата в отглеждани в лабораторни условия популации (1)(6)(9)(10).

Методи за отглеждане

Условията на отглеждане на *Lumbriculus variegatus* са подробно описани във Phipps et al. (1993) (10), Brunson et al. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). По-долу е дадено кратко резюме на тези условия.

Червеите могат да бъдат отглеждани в големи аквариуми (57—80 l) при 23 °C, с времетраене на осветлението 16 L:8 D (100—1 000 lux), като се използва ежедневно подновявана природна вода (45—50 l на аквариум). Субстратът се приготвя чрез нарязване на ленти на салфетки от неизбелена кафява хартия, които могат впоследствие да бъдат смесени с вода за отглеждането за няколко секунди, за получаване на малки парчета хартиен субстрат. След това субстратът може да бъде пряко използван в аквариумите за отглеждане на *Lumbriculus* чрез покриване на дънната област на съда, или да се съхранява замразен в дейонизирана вода за по-късна употреба. Новият субстрат в съда обикновено е с трайност около два месеца.

Всяко отглеждане на червеи започва с 500—1 000 червея и се запазва с 10 ml суспензия, съдържаща 6 g стартерни фуражи за пъстърва 3 пъти седмично в условия на прилагане на метод с обновяване или проточен метод. Скоростите на подаване на храната за статичните или полустатичните култури следва да бъдат по-малки, за да се предотврати развитието на бактерии и патогенни гъбички. Храната и хартиеният субстрат следва да бъдат анализирани за веществата, които ще бъдат използвани в изпитванията за биоаккумуляция.

При тези условия броят на индивидите в културата по принцип се удвоява приблизително за 10 до 14 дни.

Lumbriculus variegatus може да бъде отстранен от културите в отделна бехерова чаша, например чрез прехвърляне на субстрат с фина мрежа, или на организми с помощта на стъклена пипета с широк отвор с огнева полировка (приблизително 5 mm в диаметър). Ако заедно с това в тази бехерова чаша бъде прехвърлен субстрат, бехеровата чаша, съдържаща

▼ M6

червеите и субстрата, се оставя за една нощ при проточни условия, което ще отстрани субстрата от бехеровата чаша, а червеите ще останат на дъното на съда. След това те могат да бъдат въведени в наскоро приготвени съдове за отглеждане, или да бъдат допълнително обработени за изпитването, както е посочено в (1) и (6). Следва да се избягват наранявания или автотомия при червеите, напр. чрез боравене с тези червеи с използване на пипети с ръбове, полирани с огнева полировка, или с направени от неръждаема стомана клечки.

Един въпрос, който следва да бъде разгледан критично при използването на *L. variegatus* в изпитвания за биоаккумуляция със седимент, е начинът му на размножаване (архитомия, последвана от морфалаксис). В резултат от това безполово размножаване се получават два фрагмента, които не се хранят в продължение на определен период от време, докато не регенерира частта откъм главата или опашката (напр. (36)(37)). Това означава, че при *L. variegatus* поглъщането на седимент и замърсители може да не се осъществява непрекъснато, като при представителите на Tubificidae, които не се размножават чрез фрагментация.

Поради това следва да се извърши синхронизация с цел свеждане до минимум на неконтролираното размножаване и регенерация и следващото от това голямо вариране на резултатите от изпитването. Известно вариране може да се получи, когато някои от индивидите, които са се разделили на фрагменти и поради това не се хранят в продължение на определен период, са по-малко експонирани на изпитваното вещество в сравнение с другите индивиди, които не се разделят на фрагменти по време на изпитването, напр. (38). От 10 до 14 дни преди началото на експозицията червеите следва да бъдат изкуствено фрагментирани (синхронизация). Следва да се използват големи червеи, които за предпочитане не показват признаци на неотдавнашна фрагментация. Тези червеи могат да бъдат поставени върху предметно стъкло в капка вода за отглеждане и им се извършва дисекция със скалпел в средната част на тялото. Следва да се вземат мерки задните краища да са със сходен размер. След това задните краища се оставят, до началото на експозицията, за регенерация на нови глави в съд за отглеждане, съдържащ същия субстрат, като използвания при отглеждането, и възстановена вода. Има показания за регенерация на нови глави, когато синхронизираните червеи се заравят в субстрата (наличието на регенериращи глави може да бъде потвърдено чрез инспектиране на представителна подпроба с бинокулярен микроскоп). След това се очаква изпитваните организми да са със сходен физиологичен статус. Това означава, че когато по време на изпитването се извърши регенериране чрез морфалаксис в синхронизирани червеи, почти всички животни се очаква да бъдат еднакво експонирани на седимента с добавка. Храненето на синхронизираните червеи следва да се извърши веднага след като червеите започнат да се заравят в субстрата, или 7 дни след дисекцията. Режимът на хранене следва да бъде съпоставим с този при редовните култури, но може да е препоръчително синхронизираните червеи да се хранят със същия източник на храна, който ще се използва по време на изпитването. Червеите следва да се държат при температурата на изпитването, на 20 ± 2 °C. След регенерацията, за изпитването следва да се използват интактни цели червеи със сходни размери, които активно плуват или пълзят след лек механичен стимул. Следва да се избягват наранявания или автотомия при червеите, напр. чрез боравене с тези червеи с използване на пипети с ръбове, полирани с огнева полировка, или с направени от неръждаема стомана клечки.

Когато се използва *Lumbriculus variegatus*, поради специфичния за този вид начин на размножаване, следва да настъпи увеличаване на броя на червеите по време на изпитването, ако условията са подходящи (6). Липсата на размножаване в изпитването за биоаккумуляция с *L. variegatus* трябва да бъде записана и да се вземе под внимание, когато се интерпретират резултатите от изпитването.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, Oligochaeta (не е валидиран при кръгово изпитване)**

Branchiura sowerbyi обитава различни типове седименти в резервоари, езера, блата и реки, първоначално в тропически райони. Те също така могат да се намерят в топли водни обекти в северното полукълбо. Обилието им обаче е

▼ M6

по-голямо в седименти от тиня и глина с високо съдържание на органична материя. Освен това червеите обитават слоя седимент. Дори и задният край на червеите обикновено е заровен. Този вид се идентифицира лесно по хрилните нишки в задната си част. Полово зрелите индивиди могат да достигнат дължина 9-11 cm и мокро тегло от 40-50 mg. Червеите имат висока скорост на размножаване, с време за удвояване на популацията по-малко от 2 седмици и при условия на температурата и хранене, описани по-долу (Aston et al., 1982, (65)). *B. sowerbyi* е използван при изследвания както за токсичност, така и за биоаккумуляция (съответно Marchese & Brinkhurst 1996, (31) Roghair et al. 1996, (67)).

Методи за отглеждане

Обобщение на условията за отглеждане на *Branchiura sowerbyi* са дадени по-долу (предоставени от Mercedes R. Marchese, INALI, Аржентина, и Carla J. Roghair, RIVM, Нидерландия).

Не се изисква отделна техника за отглеждане на изпитваните организми. Организмите могат да бъдат отглеждани с използване на незаразен естествен седимент (31). Практическият опит е показал, че среда от естествен седимент и пясък подобрява състоянието на червеите в сравнение с това на чист естествен седимент (32) (67). За културата могат да се използват бехерови чаши от 3 l, съдържащи 1 500 ml среда седимент/вода, състояща се от 375 ml естествен незамърсен седимент (около 10 % общо съдържание на органичен въглерод; около 17 % от частиците са $\leq 63 \mu\text{m}$), 375 ml чист пясък (M32) и 750 ml възстановена или дехлорирана чешмяна вода (31) (32) (67). Хартиени салфетки също могат да се използват като субстрат за отглеждането, но растежът на популацията е по-бавен от този в естествен седимент. При полустатични системи слой вода в бехеровата чаша бавно се аерира и водата над седимента следва да бъде обновявана веднъж седмично.

За започването всяка бехерова чаша съдържа 25 млади червеи. След два месеца големите червеи се отстраняват от седимента с пинсета и се поставят в нова бехерова чаша с прясно приготвена среда седимент/вода. Старата бехерова чаша съдържа също така пашкули и млади червеи. По този начин могат да се съберат до 400 млади червея на чаша. Полово зрелите червеи могат да се използват за размножаване поне една година.

Културите следва да бъдат поддържани при температура от 21 до 25 °C. Варирането на температурата следва да се поддържа под ± 2 °C. Времето, необходимо за ембрионално развитие от полагането на яйцето до напускането на пашкулчето е около три седмици при 25 °C. Установено е, че получените яйца на преживял червей при *B. sowerbyi* варират от 6,36 (31) до 11,2 (30) в кал при 25 °C. Броят на яйцата на пашкулче варира от 1,8 до 2,8 (66) (69) или до 8 (68).

Разтвореният кислород, твърдостта на водата, температурата и рН трябва да се измерват всяка седмица. Храна за риби (напр. TetraMin®) може да бъде допълвана като суспензия два или три пъти седмично *ad libitum*. Червеите могат също така да бъдат хранени с размразена маруля *ad libitum*.

Основно предимство на този вид е високата индивидуална биомаса (до 40-50 mg мокро тегло на индивид). Поради това този вид може да се използва за изпитване на биоаккумуляцията на изпитвани вещества, които не са изотопно белязани. Той може да бъде експониран в системите, използвани за *T. tubifex* или *L. variegatus* с един-единствен индивид на повторение (11). Тогава обаче повторенията следва да бъдат увеличени, освен ако не се използване по-големи камери за изпитване (11). Освен това критерият за валидност, свързан с поведението на червеите при заравяне, трябва да бъде коригиран за този вид.

▼ M6

ЛИТЕРАТУРА

- (1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (2) European Commission (EC) (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I — IV. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- (3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.
- (4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.
- (5) Глава В.13 от настоящото приложение, Биоконцентрация: проточен тест за риби.
- (6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (7) Глава В.27 от настоящото приложение, „Изпитване за токсичност за хирономиди в система вода–седимент с използване на седимент с добавка“.
- (8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (*Oligochaeta*) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.
- (9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.
- (10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic *Oligochaete Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes“, 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.
- (13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a *Thalassia* seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301-310.

▼ **M6**

- (14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim
- (15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709-1725.
- (16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443-1450.
- (17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24, 1225-1231.
- (18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.
- (19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501-1514.
- (20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.
- (22) Следните глави от настоящото приложение:
- Глава А.4, парно налягане
- Глава А.5, повърхностно напрежение
- Глава А.6, разтворимост във вода
- Глава А.8, коефициент на разпределение, метод „разклащане в стъклена леница“
- Глава А.24, коефициент на разпределение, метод ВЕТХ
- Глава В.7, Разграждане — абиотично разграждане: хидролиза като функция от рН
- Глава В.4. „Определяне на пряката биологична разградимост“ (методи от А до Е)
- Глава В.19, Изчисляване коефициента на адсорбция (K_{oc}) на почвата и на утайката от отпадъчни води с използване на високоефективна течна хроматография (ВЕТХ)
- Глава В.29, Лесна биоразградимост — CO_2 в запечатани съдове
- (23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paris.
- (24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, 165-172.

▼ M6

- (25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), *The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J* (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22, 701-707.
- (28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1061-1072.
- (30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. *Aquaculture* 26, 155-160.
- (31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia* 334, 163-168.
- (32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719102027.
- (33) Глава В.1 от настоящото приложение, Изпитване за остра токсичност при риби.
- (34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.
- (35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.
- (36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
- (39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology* 8, 111-124.

▼ M6

- (40) Глава В.8 от настоящото приложение, Токсичност за земни червеи.
- (41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23, 588-595.
- (43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): *Aquatic Oligochaeta Biology*, 175-184. Plenum Press, New York.
- (44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.
- (45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.
- (46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. *Chemosphere* 32, 1897-1905.
- (47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1244-1249.
- (48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1431-1436.
- (49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micro-methods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography*, 30, 1099-1105.
- (50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- (51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- (53) Zok, S., Gorge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Sci. Total Environment* 109/110, 411-421
- (54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische — Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.
- (55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.

▼ **M6**

- (57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- (59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. *Arch. Hydr.* 63, 310-386.
- (60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. *Environ. Sci. Technol.* 21, 785-790.
- (61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 47-67.
- (62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 69-78.
- (63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No.* 22.
- (65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. *Aquaculture* 29, 137-145.
- (67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge *Chironomus riparius* and the tubificid oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719101026.
- (68) Aston, R.J. (1984). The culture of *Branchiura sowerbyi* (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. *Aquaculture* 40, 89-94.
- (69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 278, 267-274.

▼ **M7****В.47. РИБИ, ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ НА РАННИ СТАДИИ ОТ ЖИЗНЕНИЯ ЦИКЪЛ****ВЪВЕДЕНИЕ**

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 210 (2013). Изпитванията, отнасящи се за ранните стадии при риби, имат за цел определяне на леталните и сублеталните въздействия на химикалите върху изпитваните стадии и видове. Те дават информация от значение за оценка на хроничните летални и сублетални въздействия на химикалите върху други видове риби.
2. Насоките за изпитване 210 се основават на предложение от страна на Обединеното кралство, което бе обсъдено на среща на експерти на ОИСП, състояла се в Medmenham (Обединено кралство) и са актуализирани през 2013 г., за да се отрази опитът при използването на изпитването и препоръките от семинар на ОИСП за изпитване за токсичност при риби, проведен през септември 2010 г. (1).

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

3. Рибите на ранни стадии се експонират на обхват от концентрации на изпитвания химикал, разтворен във вода. Предпочитат се проточни условия; независимо от това, ако не е възможно, приемливи са полустатични условия. За повече подробности следва да се консултира Ръководството на ОИСП с насоки за изпитване за токсичност във водна среда на трудни вещества и смеси (2). Изпитването започва с поставяне на оплодените хайверни зърна в камерите за изпитване и продължава за период от време, специфичен за животинския вид, който е необходим за достигане на контролните риби до ювенилен стадий от жизнения цикъл. Леталното и сублеталното въздействие се оценяват и сравняват със стойностите при контролите, за да се определи най-ниска концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC) с цел да се определи i) концентрацията без наблюдавано въздействие (NOEC) и/или ii) ЕС_x (напр. ЕС₁₀, ЕС₂₀), като се използва регресионен модел, за да се оцени концентрацията, която би причинила x % изменение на измерваното въздействие. Протоколирането на относимите концентрации с определено въздействие и параметри може да зависи от регулаторната рамка. Изпитваните концентрации трябва да обграждат ЕС_x (напр. ЕС₁₀, ЕС₅₀) така, че ЕС_x впоследствие да се получи след интерполация, а не след екстраполация (вж. допълнение 1 за определения).

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНИЯ ХИМИКАЛ

4. Изпитваният химикал се отнася до това, което се изпитва. Разтворимостта във вода (вж. глава А.6 от настоящото приложение) и парното налягане (вж. глава А.4 от настоящото приложение) на изпитвания химикал трябва да са известни и да е на разположение надежден аналитичен метод за количествено определяне на химикала в изпитваните разтвори с известни и протоколирани точност и граница на количествено определяне. Въпреки че не са необходими за извършване на изпитването, резултатите от изпитването за остра токсичност (вж. глави В.1 или В.49 от настоящото приложение), за предпочитане извършено с видовете, избрани за настоящото изпитване, могат да предоставят полезна информация.
5. Ако методът за изпитване се използва за изпитване на смес, нейният състав следва да се охарактеризира възможно най-пълно, например чрез химичната идентичност на нейните съставки, количествения състав и специфичните свойства на веществата (като упоменатите по-горе). Преди използването на метода на изпитване за регулаторни изпитвания на смес, трябва да бъде преценено дали той ще предостави приемливи резултати за набелязаната регулаторна цел.
6. Полезна информация включва структурната формула, чистотата на веществото, стабилността във вода и на светлина, рK_a, P_{ow} и резултати от изпитване за пълна биоразградимост (напр. глава В.4 или В.29 от настоящото приложение).

▼ **M7****ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО**

7. За да бъде валидно дадено изпитване се прилагат следните условия:
- концентрацията на разтворен кислород трябва да бъде >60 % от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух (ASV) по време на изпитването;
 - температурата на водата не трябва да се различава с повече от $\pm 1,5$ °C между камерите за изпитване или между последователните дни по всяко време на изпитването, и следва да се поддържа в рамките на температурните диапазони, посочени за изпитваните видове (допълнение 2);
 - аналитичното измерване на концентрациите на изпитване е задължително.
 - цялостната преживяемост на оплодените хайверни зърна в контролите и преживяемостта след излюпване и, където е относимо, в контролите на разтворител, трябва да бъде по-голяма или равна на границите, определени в допълнение 2;
8. Ако се наблюдава малко отклонение от критериите за валидност на изпитването, последиците следва да се съобразят с надеждността на данните от изпитването и тези съображения следва да бъдат включени в протокола. Въздействията върху преживяемостта, излюпването или растежа при контролата на разтворител, в сравнение с отрицателната контрола, следва да бъдат протоколирани и обсъдени в контекста на надеждността на данните от изпитването.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**Камери за изпитване**

9. Могат да се използват всякакви съдове от стъкло, неръждаема стомана или други химически неутрални материали. Тъй като за силикона е известно, че проявява висок капацитет за абсорбиране на липофилни вещества, използването на силиконови тръби при проточните изследвания и използването на силиконови запушалки в контакт с вода следва да бъде сведено до минимум чрез използването например на монолитни стъклени аквариуми. Размерите на съдовете следва да са достатъчно големи, за да позволяват подходящ растеж в контролата, поддържане на концентрацията на разтворен кислород (напр. при малки видове риби това се постига със съд с обем 7 l) и съответствие с критериите за скорост на зареждане, посочени в точка 19. Препоръчва се камерите за изпитване да са разположени на случаен принцип в зоната на извършване на изпитването. Рандомизираният блоков план, при който всяко третиране е налично във всеки блок, се предпочита пред напълно рандомизирания. Камерите за изпитване следва да са защитени от нежелани смущения. За предпочитане е системата за изпитване да бъде кондиционирана с концентрации на изпитвания химикал за достатъчно дълъг период, за да се докажат стабилни концентрации на експозиция преди въвеждането на изпитваните организми.

Избор на видове

10. Препоръчаните видове риби са дадени в таблица 1. Това не изключва използването и на други видове, но за постигане на подходящи условия на изпитването може да се наложи адаптиране на процедурата за изпитване. В този случай следва да се протоколира основанието за избор на видовете и на опитния метод.

Отглеждане за рибите за размножаване

11. Подробности относно отглеждането на рибния запас за размножаване при задоволителни условия могат да се намерят в допълнение 3 и в препратки към използваната литература (3) (4) (5).

Третиране на оплодените хайверни зърна, ембрионите и ларвите

12. Първоначално оплодените хайверни зърна, ембрионите и ларвите могат да се експонират, в рамките на основния съд, в по-малки съдове от

▼ **M7**

стъкло или неръждаема стомана, снабдени със страни или краища с отвори, за да се позволи протичане на изпитвания разтвор през съда. Нетурбулентно протичане през тези малки съдове може да се предизвика чрез поставянето им на ръчка, монтирана да премества съда нагоре и надолу, но като запазва винаги организмите във водата. Оплодените хайверни зърна на риби от семейството на съомгата могат да се запазват с решетки или сито с достатъчно широки отвори, които да позволяват на ларвите да преминават през тях след излюпването.

13. Когато за задържане на хайвера в основния съд за изпитване са били използвани контейнери с хайвер, решетки и сита, тези ограничители следва да се отстранят след излюпването на ларвите, съгласно насоките в допълнение 3, с изключение на ситата, които следва да се задържат, за да се предотврати изпускането на ларвите. Ако има нужда от прехвърляне на ларвите, те следва да не се излагат на въздух и не следва да се използват мрежи, да за се освободят ларвите от контейнерите с хайвера. Графикът за това прехвърляне е различен за различните видове и следва да се документира в протокола. Независимо от това прехвърляне не е винаги необходимо.

Вода

14. Всяка вода, в която изпитваният вид показва съответните признаци за дългосрочна преживяемост и растеж, може да се използва като вода за изпитването (вж. допълнение 4). Необходимо е постоянно качество на водата по време на изпитването. За да се гарантира, че водата за разреждане няма да повлияе неправилно върху резултата от изпитването (например чрез образуване на комплекс с изпитвания химикал) или да навреди на рибния запас за размножаване, пробите за анализ следва да се вземат на интервали. Правят се измервания на тежки метали (например Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), основни аниони и катиони (например Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), амоняк, общо пестициди с остатъчни нива на хлор, общ органичен въглерод и суспендирани твърди частици, например два пъти годишно, когато се знае, че водата за разреждане има относително постоянно качество. В случаите, когато е известно, че водата е с променливо качество, измерванията трябва да се провеждат по-често; честотата зависи от това колко променливо е качеството. Някои от химичните характеристики на приемливата вода за разреждане са изброени в допълнение 4.

Разтвори за изпитване

15. За изпитванията с проточна система се изисква система, която постоянно подава и разрежда изходен разтвор на изпитвания химикал (например система с измерваща помпа, пропорционално разреждащо устройство, сатуратор), за да се подават серии от концентрации към камерите за изпитване. Дебитът на изходните разтвори и този на водата за разреждане следва да се проверяват на интервали по време на изпитването и през това време не следва да варират с повече от 10 %. За подходящ се счита дебит, равен на поне пет обема на камера за изпитване за 24 часа (3). Независимо от това, ако се спазва скоростта на зареждане, посочена в параграф 19, за предотвратяване на бързото отстраняване на храна е възможна по-ниска скорост на протичане, напр. 2-3 обема на камера за изпитване.
16. Разтворите за изпитване при избраните концентрации се приготвят чрез разреждане на изходен разтвор. Изходният разтвор се приготвя за предпочитане чрез просто смесване и разбъркване на изпитвания химикал във водата за разреждане с помощта на механични средства (например разклащане и/или ултрасонификация). За постигане на подходящо концентриран изходен разтвор могат да се използват колони за насищане (колони за разтворимост) или методи за пасивно дозиране (6). Използването на разтворител за носител не е препоръчително. Независимо от това, в случай че е необходим разтворител, успоредно следва да се стартира изпитване с контрола на разтворител, при същата концентрация на разтворител, като тази при третиранията с химикала; т.е. нивото на разтворителя следва за предпочитане да бъде еднакво във всички концентрации, както и в контролата на разтворител. За някои системи за разреждане това може да е трудно от техническа гледна точка; тук концентрацията на разтворителя в контролата на разтворител следва да е равна на най-високата концентрация на разтворителя в третираната група. За вещества, които са трудни за изпитване, следва да се консултира Ръководство № 23 на ОИСР с насоки за изпитване за

▼ **M7**

токсичност във водна среда на трудни вещества и смеси (2). Ако се използва разтворител, изборът на разтворител се определя в зависимост от химичните свойства на веществото. В Ръководство № 23 на ОИСП се препоръчва максимална концентрация от 100 µl/l. За да се избегне потенциалното влияние на разтворителя върху измерените крайни точки (7), препоръчително е концентрацията на разтворителя да се поддържа възможно най-ниска.

17. При полустатичните изпитвания могат да се следват две различни процедури за обновяване. Или се приготвят нови разтвори за изпитване в чисти съдове и преживелите хайверни зърна и ларви внимателно се пренасят в новите съдове, или изпитваните организми се запазват в съдовете за изпитване, като известен дял (поне две трети) от обема на разтвора за изпитване/контролата се сменя.

ПРОЦЕДУРА**Условия на експозиция***Продължителност*

18. Изпитването трябва да започне възможно най-бързо след оплождането на хайверните зърна, като е за предпочитане те да са потопени в разтворите за изпитване преди започването на дробенето на блас-тодиска или колкото е възможно по-скоро след този етап. Продължителността на изпитването зависи от видовете, които се използват. Някои препоръчителни продължителности са дадени в допълнение 2.

Зареждане

19. Броят на оплодените хайверни зърна в началото на изпитването следва да е достатъчен за спазване на статистическите изисквания. Те следва да са разпределени на случаен принцип сред третираната и минимум 80 хайверни зърна, разпределени по равно между най-малко четири камери за изпитване с повторения, следва да бъдат използвани за всяка концентрация. Скоростта на зареждане (биомаса на обем разтвор за изпитване) следва да е достатъчно ниска с оглед поддържане на концентрация на разтворен кислород от поне 60 % от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух без вентилация по време на стадите хайверни зърна и ларви. За изпитванията с проточна система се препоръчва скорост на зареждане не по-голяма от 0,5 g мокро тегло/l за 24 часа и не повече от 5 g/l от разтвора по всяко време (3).

Светлина и температура

20. Продължителността на излагане на светлина и температурата на водата следва да са подходящи за изпитваните видове (допълнение 2).

Хранене

21. Храната и храненето са изключително важни и е от съществено значение да се предоставя подходящата храна за всеки стадий от жизнения цикъл, в подходящо време и в количества, които са достатъчни за поддържане на нормален растеж. Храненето следва да бъде приблизително равно в повторенията, освен ако не е коригирано, за да отчете смъртността. Излишната храна и изпражненията трябва да бъдат отстранявани, когато е необходимо, за да се избегне натрупване на отпадъци. Подробни хранителни режими са дадени в допълнение 3, но с натрупването на опит храната и хранителните режими непрекъснато се усъвършенстват с оглед подобряване на преживяемостта и оптимизиране на растежа. Живата храна осигурява източник за облагородяване на околната средата и следователно следва да се използва вместо сухата или замразена храна, или в допълнение към нея, когато това е подходящо за вида и стадия от жизнения цикъл.

Концентрации на изпитване

22. Обичайно се изискват пет концентрации на изпитвания химикал, с минимум четири повторения на концентрация, разделени на равни интервали с кратност, която не надвишава 3,2. При избирането на обхвата на изпитваните концентрации следва да бъдат разгледани информацията за изпитвания за остра токсичност, за предпочитане със същите видове, и/или изпитване за определяне на обхвата (1), ако са налични. Независимо от това, при избирането на обхвата на изпитваните концентрации следва да бъдат разгледани всички източници на информация, включително източници като например „read across“, данни от

▼ **M7**

изпитвания за остра токсичност за рибни ембриони. Когато трябва да бъдат установени само емпирични NOEC, като окончателно изпитване може да бъде приемливо гранично изпитване или разширено гранично изпитване с по-малко от пет концентрации. Трябва да се представи обосновка, ако са използвани по-малко от пет концентрации. Не е нужно да се изпитват концентрации на изпитвания химикал, по-високи от 96-часова LC₅₀, или 10 mg/l, според това коя от двете е по-ниска.

Контроли

23. в допълнение към серията от концентрации на изпитвания химикал следва да се изпита само една контрола на вода за разреждане и, ако е необходимо, една контрола на разтворител, съдържаща използван разтворител за носител (вж. точка 16).

Честота на аналитичните определяния и измервания

24. Преди започване на периода на експозиция следва във всички повторения да бъде гарантирано правилното функциониране на системата за доставяне на химикала (например чрез измерване концентрации на изпитване). Следва да се установят изискваните методи за анализ, в това число подходяща граница на количествено определяне (LOQ) и достатъчни познания за стабилността на веществото в системата за изпитване. По време на изпитването концентрациите на изпитвания химикал се определят през постоянни интервали, за да се характеризира експозицията. Необходими са най-малко пет определяния. При проточните системи аналитичните измервания на изпитвания химикал в едно повторение за всяка концентрация следва да бъдат извършвани поне един път седмично, със систематична смяна между повторенията. Допълнителните аналитични определяния често подобряват качеството на резултатите от изпитването. Може да е необходимо пробите да бъдат филтрувани за отстраняване на всякакви твърди частици (например с използване на размер на порите 0,45 µm) или центрофугирани, за да се гарантира, че определянията на химикала се правят в истински разтвор. С цел да се намали адсорбцията на изпитвания химикал, филтрите трябва да бъдат наситени преди употреба. Когато измерените концентрации не остават в рамките на 80-120 % от номиналната концентрация, концентрации с определено въздействие трябва да бъдат определени и изразени по отношение на средноаритметичната стойност на концентрацията за проточните изпитвания (вж. допълнение 6 към метод за изпитване В.20 за изчисляването на средноаритметичната стойност (8)), и изразени по отношение на средната геометрична стойност на измерените концентрации за полустатичните изпитвания (вж. глава 5 в Ръководството на ОИСР за изпитване за токсичност във водна среда на трудни вещества и смеси (2)).
25. По време на изпитването разтвореният кислород, рН и температурата следва да се измерват във всички съдове за изпитване поне веднъж седмично, а солеността и твърдостта — в началото и в края на изпитването, ако има основания за това. За предпочитане е температурата да се наблюдава непрекъснато най-малко в един съд за изпитване.

Наблюдения

26. **Стадий на ембрионално развитие:** стадият на развитие на ембриона в началото на експозицията на изпитвания химикал следва да бъде проверен колкото е възможно по-точно. Това може да се направи, като се използва представителна извадка от хайверни зърна, запазени и изчистени по подходящ начин.
27. **Излюпване и преживяемост:** наблюденията върху излюпването и преживяемостта следва да се правят поне веднъж на ден и се записва броят. Ако в началото на ембрионално развитие се наблюдават гъбички върху хайверните зърна (например в първия или втория ден от изпитването), тези хайверни зърна трябва да бъдат преброени и отстранени. Мъртвите ембриони, ларви и ювенилни екземпляри следва да се отстраняват веднага след като са забелязани, тъй като могат да се разложат бързо и да бъдат разкъсани от действията на другите риби. При отстраняването на мъртвите индивиди се полага изключителна грижа да не се наранят физически близкостоящите хайверни зърна/ларви. Признаците на смърт варират в зависимост от видовете и стадия от жизнения цикъл. Например:

▼ **M7**

- за новооплодени хайверни зърна: по-специално в ранните стадии това са: явна загуба на прозрачност и изменение в оцветяването, причинени от коагулация и/или утаяване на белтъци, водещи до бял непрозрачен вид;
 - за ембрионите, ларвите и ювенилните екземпляри: неподвижност и/или липса на дихателни движения и/или липса на сърдечен ритъм и/или липса на реакция при механично стимулиране.
28. **Необичаен външен вид:** броят на ларвите и ювенилните екземпляри, които показват необичайна форма на тялото, следва да се записва на подходящи интервали в зависимост от продължителността на изпитването, а природата на необичайността във външния вид следва да се опише. Следва да се отбележи, че ларвите с аномалии и ювенилните екземпляри се срещат по естествен път и могат да бъдат от порядъка на няколко процента от контролата(ите) при някои видове. Когато деформациите и свързаното с тях необичайно поведение се смятат за толкова сериозни, че се наблюдава значително страдание за организма, и то е достигнало до точка, отвъд която няма да има възстановяване, той може да бъде отстранен от изпитването. Такива животни следва да бъдат умъртвени и третираны като смъртност при последващия анализ на данните. За повечето видове, които се препоръчват в настоящия метод за изпитване, е документирано нормално ембрионално развитие (9) (10) (11) (12).
29. **Необичайно поведение:** необичайното поведение, като хипервентилация, некоординирано плуване, нетипично състояние на покой и нетипично поведение при хранене, следва да се записват на достатъчни интервали в зависимост от продължителността на изпитването (например веднъж дневно за видове, обитаващи топли води). Тези въздействия, въпреки че е трудно да бъдат определени количествено, могат при наблюдаване да допринесат за тълкуването на данните за смъртността.
30. **Тегло:** в края на изпитването всички преживели риби се претеглят на база повторения (като се протоколира броят животни в съответното повторение и средното тегло за животно): мокрото тегло (след попиване на водата) се предпочита, но независимо от това данните за сухото тегло също могат да бъдат протоколирани (13).
31. **Дължина:** в края на изпитването следва да се измерят индивидуалните дължини. Препоръчва се обща дължина, но ако се появят гниене на опашния плавник или ерозия на перка, може да се използва стандартна дължина. За всички риби в дадено изпитване следва да бъде използван един и същ метод. Индивидуалната дължина може да бъде измерена например с шублер, цифров фотоапарат или калибриран окулярен микрометър. Типичните минимални дължини са определени в допълнение 2.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Обработка на резултатите**

32. Препоръчва се планът на опита и изборът на статистическия тест да позволяват достатъчна мощност (80 % или по-голяма) за откриване на изменения от биологично значение в крайните точки, за които се протоколира НОЕС. Протоколирането на относимите концентрации с определено въздействие и параметри може да зависи от регулаторната рамка. Ако следва да бъде протоколирана дадена EC_x , планът на опита и изборът на регресионен модел следва да дават възможност за оценка на EC_x , така че i) 95-процентният доверителен интервал, протоколиран за EC_x , да не съдържа нула и да не е прекомерно широк, ii) 95-процентният доверителен интервал за прогнозната средна стойност в EC_x не съдържа контролната средна стойност, iii) няма значима липса на съгласуваност на регресионния модел с данните. Всеки подход изисква определянето на процентното изменение във всяка крайна точка, което е важно да бъде открито или оценено. Планът на опита следва да бъде изготвен така, че да се даде възможност за това. Когато посочените по-горе условия за определяне на EC_x не са изпълнени, следва да се използва НОЕС подходът. Малко вероятно е както едно и също процентно изменение да се прилага за всички крайни точки, така и осъществим опит да може да бъде планиран по такъв начин, че да отговаря на тези критерии за всички крайни точки, поради което при

▼ **M7**

планирането на опита по подходящ начин е важно вниманието да се насочи към крайните точки, които са от значение за съответния опит. Статистически блокови схеми и насоки за всеки подход са на разположение в допълнения 5 и 6, като те дават насоки за обработката на данните и за избора на най-подходящия статистически тест или модел. Могат да се използват други статистически подходи, при условие че са научно обосновани.

33. Ще бъде необходимо варирането да се анализира във всеки набор от повторения, като се използват дисперсионен анализ или таблица на спрегнатост, и въз основа на този анализ се използват подходящи статистически методи за анализ. За да се направи множество сравнение на резултатите при индивидуалните концентрации и тези при контролите, се препоръчват тест на Йонкхере-Терпстра със стъпка назад или тест на Уйлямс за непрекъснатия отклик, и тест на Кокрън-Армитидж със стъпка назад за двоичния отклик, които са съвместими с монотонна зависимост концентрация-отклик и липсват доказателства за дисперсия, по-голяма от очакваната при биномно разпределение (14). Когато има доказателства за дисперсия, по-голяма от очакваната при биномно разпределение, се препоръчва модификация на Рао-Скот на теста на Кокрън-Армитидж (15) (16), или към съотношенията от повторенията се прилагат тестовете на Уйлямс или на Дънет (след трансформация „аркусинус от корен квадрата“), или тестът на Йонкхере-Терпстра. Когато данните не са съвместими с монотонна зависимост концентрация-отклик, методите на Дънет или на Дън, или на Ман-Уитни, може да се окажат полезни за непрекъснат отклик, а точният тест на Фишер — за двоичен отклик (14) (17) (18). Когато се прилага какъвто и да е статистически метод или модел, следва да се внимава да се гарантира удовлетворяването на изискванията на метода или модела (например от камера до камера се оценява и отчита при плана на опита и изпитването и използвания статистически тест или модел). Данните трябва да се оценяват по отношение на тяхната нормалност, като допълнение 5 посочва какво следва да се направи по отношение на остатъците в рамките на ANOVA. В допълнение 6 се разглеждат допълнителни съображения за регресионния подход. Следва да бъдат взети предвид трансформации с оглед удовлетворяване на изискванията за даден статистически тест. Независимо от това трансформациите, които да позволят изглаждането с регресионен модел, изискват голямо внимание, тъй като например 25 % изменение в нетрансформиран отклик не съответства на 25 % изменение в трансформиран отклик. Във всички анализи обектът за анализ и опитната единица е камерата за изпитване, а не отделната риба, и както тестването на хипотези, така и регресиията, трябва да са съобразени с това (3) (14) (19) (20).

Протокол от изпитването

34. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал:

Вещество с една съставка

- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- химична идентификация, като наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, SMILES или InChI код, структурна формула, чистота, химическа идентичност на онеочистванията, както е целесъобразно и практически осъществимо и др. (включително съдържание на органичен въглерод, ако е уместно).

Вещество с повече съставки, UVCB и смеси:

- характеризирани, доколкото е възможно, напр. от химичната идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Изпитван вид:

- научно наименование, порода, източник и метод на събиране на оплодените хайверни зърна и последващо боравене.

▼ M7

Условия на изпитването:

- използвана процедура на изпитване (напр. полустатична или проточна, зареждане);
- Продължителност(и) на излагане на светлина;
- план за изпитването (напр. брой на камерите за изпитване и повторенията, брой хайверни зърна в едно повторение, материал и размери на камерата за изпитване (височина, ширина, обем), обем вода на камера за изпитване);
- метод за приготвяне на изходния разтвор и честота на обновяване (при използване трябва да се посочат разтворителят и неговата концентрация);
- метод на дозиране на изпитвания химикал (напр. помпи, системи за разреждане)
- коефициентът на аналитичния добив на метода и номиналните концентрации на изпитване, границата на количествено определяне, средните на измерените стойности и техните стандартни отклонения в съдовете за изпитване, методът за получаването им и доказателство, че измерванията се отнасят за концентрациите на изпитвания химикал в истински разтвор;
- характеристики на разтворимост във вода: рН, твърдост, температура, концентрация на разтворен кислород, нива на остатъци от хлор (ако са измерени), общо органичен въглерод (ако е измерен), суспендирани твърди частици (ако са измерени), соленост на изпитваната среда (ако е измерена) и всички други направени измервания;
- качество на водата в съдовете за изпитване, рН, твърдост, температура и концентрация на разтворен кислород;
- подробна информация за храненето (например вид на храната или храните, източник, дадено количество и честота).

Резултати, протоколирани на индивидуална база (или на база повторения) и като средна стойност и коефициент на вариация, според конкретния случай, за следните крайни точки:

- доказателство, че при контролите е изпълнен стандартът за приемливост по отношение на общата преживяемост за изпитваните видове (допълнение 2);
- данни за смъртността на всеки стадий (ембрион, ларва и ювенилен екземпляр) и кумулативна смъртност;
- дни до излюпването, брой на ларвите, които се излюпват всеки ден, и край на излюпването;
- брой на здравите риби в края на изпитването;
- данни за дължината (посочва се дали е стандартна или обща) и теглото на преживелите животни;
- срещане, описание и брой на морфологичните аномалии, ако има такива;
- срещане, описание и брой на въздействията върху поведението, ако има такива;
- подход за статистическия анализ (регресионен анализ или дисперсионен анализ) и обработката на данните (използван статистически тест или модел);
- концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC) за всеки оценен отклик;

▼ **M7**

- най-ниска концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC) (при $p = 0,05$) за всеки оценен отклик;
- EC_{50} а всеки оценен отклик, ако е приложимо, и доверителен интервал (напр. 90 % или 95 %) и графика на изгладения модел, използван за нейното изчисляване, наклон на кривата концентрация-отклик, формула на регресионния модел, очакваните параметри на модела и техните стандартни грешки.

Всякакви отклонения от метода за изпитване:

Обсъждане на резултатите, включително всякакво влияние на отклонения от метода за изпитване върху резултата от изпитването.

Таблица 1

Видове риби, които се препоръчват за изпитване

СЛАДКОВОДНИ	ЕСТУАРНИ и МОРСКИ
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Дъгова пъстърва	<i>Cyprinodon variegatus</i> Cyprinodon variegatus
<i>Pimephales promelas</i> Pimephales promelas	Menidia sp. Атерина
<i>Danio rerio</i> Зеброво данио	
<i>Oryzias latipes</i> Японска оризия или Медака	

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Paris.
- (2) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, OECD Paris.
- (3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88. 26 pp.
- (4) Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (5) Brungs, W.A. and B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (6) Adolfsson-Erici, *et al.* (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593-599.
- (7) Hutchinson, T.H. *et al.* (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.
- (8) Глава B.20 от настоящото приложение, Изпитване за размножаване на *Daphnia magna*.
- (9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.
- (10) Kimmel, H. B.*et al.* (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

▼ M7

- (11) Gonzalez-Doncel, M. *et al* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthyidae) *Journal of Applied Ichthyology*, 20:1–14.
- (12) Devlin, E.W. *et al.* (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C..
- (13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, *Environmental Toxicology and Chemistry* 31; 2, 370 — 376.
- (14) OECD (2006). *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.
- (15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, 577-585.
- (16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, *Statistics in Medicine* 18, 1373-1385.
- (17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of American Statistical Association*, 50, 1096-1121.
- (18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.
- (19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publication Corporation, New York.
- (20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). *Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data*, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼ **M7**

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

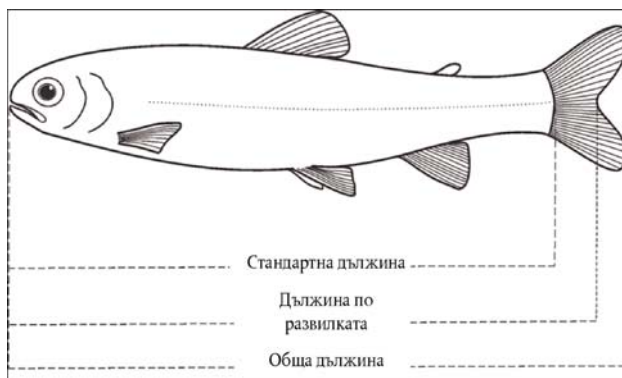
Дължина на тялото до развилката на опашната перка (FL): отнася се за дължина от върха на муцуната до края на средните лъчи на опашната перка и се използва при риби, при които е трудно да посочи края на гръбначния стълб (www.fishbase.org)

Стандартна дължина (SL): отнася се за дължина на рибата, измервана от върха на муцуната до задния край на последния прешлен или до задния край на средно-страничната част на подопашната става. По-просто казано, това измерване изключва дължината на опашната перка. (www.fishbase.org)

Обща дължина (TL): отнася се за дължина от върха на муцуната до върха на по-дългият дял от опашната перка, обикновено измерван чрез притискане на дяловете по дължината на страничната линия. Това е измерване по права линия, не се измерва по контура на тялото (www.fishbase.org)

Фигура 1

Описание на използваните различни дължини



Химикал: вещество или смес.

ЕС_x: (концентрация, при която се наблюдава x % от въздействието) е концентрацията, която причинява x % от дадено въздействие върху изпитвани организми в рамките на даден период на експозиция, при сравнение с контрола. Например ЕС₅₀ е концентрация, за която е направена оценка, че предизвиква дадено въздействие върху изпитвана крайна точка в 50 % от експонираната популация в рамките на определен период на експозиция.

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

Най-ниска концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC) е най-ниската изпитвана концентрация на изпитван химикал, при която за химикала се наблюдава статистически значимо въздействие (при $p < 0,05$) в сравнение с контролата. Независимо от това, всички изпитвани концентрации над LOEC трябва да имат вредно въздействие, равно или по-голямо от наблюдаваното при LOEC. Когато тези две условия не могат да бъдат удовлетворени, трябва да се даде цялостно обяснение за това как е била избрана LOEC (и следователно NOEC). В допълнения 5 и 6 се предоставят насоки.

Концентрацията без наблюдавано въздействие (NOEC) е изпитваната концентрация непосредствено под LOEC, която при сравнение с контролата няма статистически значимо въздействие ($p < 0,05$) в рамките на даден период на експозиция.

UVCB: Вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Международен съюз по чиста и приложна химия).

SMILES: Спецификация за опростено линейно въвеждане на молекули (Simplified Molecular Input Line Entry Specification).

УСЛОВИЯ ЗА ИЗПИТВАНЕ, ПРОДЪЛЖИТЕЛНОСТ И КРИТЕРИИ ЗА ПРЕЖИВЯЕМОСТ ПРИ ПРЕПОРЪЧАНИТЕ ВИДОВЕ

ВИДОВЕ	УСЛОВИЯ НА ИЗПИТВАНЕ			ПРЕПОРЪЧИТЕЛНА ПРОДЪЛЖИТЕЛНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО	Типична минимална средна обща дължина на контролните риби в края на изследването (mm) ⁽¹⁾	ПРЕЖИВЯЕМОСТ ПРИ КОНТРОЛИТЕ (минимална)	
	Температура (°C)	Соленост (‰)	Период на излагане на светлина (часове)			при излюпването	след излюпването
Сладководни:							
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Дъгова пъстърва	10 ± 1,5 ⁽²⁾		12 – 16 ⁽³⁾	2 седмици след хранене ad libitum на контролите (или 60 дни след излюпване)	40	75 %	75 %
<i>Pimephales promelas</i> Pimephales promelas	25 ± 1,5		16	32 дни след началото на изпитването (или 28 дни след излюпване)	18	70 %	75 %
<i>Danio rerio</i> Зеброво данио	26 ± 1,5		12 – 16 ⁽⁴⁾	30 дни след излюпване	11	70 %	75 %
<i>Oryzias latipes</i> Японска оризия или Медака	25 ± 2		12– 16 ⁽⁴⁾	30 дни след излюпване	17	80 %	80 %
Естуарни и Морски:							
<i>Cyprinodon variegatus</i> Cyprinodon variegatus	25 ± 1,5	15-35 ⁽⁵⁾	12 – 16 ⁽⁴⁾	32 дни след началото на изпитването (или 28 дни след излюпване)	17	75 %	80 %
<i>Menidia sp.</i> Атерина	22 – 25	15-35 ⁽⁵⁾	13	28 дни	20	80 %	60 %

Легенда:

- (1) Типичната минимална средна обща дължина не е критерий за валидност, но отклоненията под указаната стойност следва внимателно да се проучат по отношение на чувствителността на изпитването. Минималната средна обща дължина е резултат от подбор на наличните данни към настоящия момент.
- (2) Конкретната порода изпитвана дъгова пъстърва може да наложи използването на други температури. Рибният запас за размножаване трябва да се отглежда при същата температура като тази, която се използва за хайверните зърна. След доставката на получени от търговската мрежа хайверни зърна е необходимо кратко адаптиране (напр. 1-2 часа) към температурата на изпитване.
- (3) Тъмнина за ларвите до една седмица след излюпването, с изключение на времето, когато се наблюдават, след това омокотена светлина по време на изпитването (12-16 часа излагане на светлина) ⁽⁴⁾.
- (4) Независимо от условията на изпитване режимът на осветяване трябва да бъде постоянен.
- (5) За всяко изпитване не трябва да варира повече от ± 2 ‰.

НАСОКИ ЗА ХРАНЕНЕ И БОРАВЕНЕ ЗА ЖИВОТНИТЕ ЗА РАЗВЪЖДАНЕ И ЖИВОТНИТЕ ЗА ИЗПИТВАНЕ ОТ ПРЕПОРЪЧВАНИТЕ ВИДОВЕ

ВИДОВЕ	ХРАНА (*)				ВРЕМЕ НА ПРЕХВЪРЛЯНЕ СЛЕД ИЗЛЮПВАНЕ	ВРЕМЕ ДО ПЪРВОТО ХРАНЕНЕ
	Риби за размножаване	Новоизлюпени ларви	Ювенилни екземпляри			
			Тип	Честота		
Сладководни:						
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Дъгова пъстърва	храна за пъстърва	Няма ^(а)	стартова храна за пъстърва науплии от артемии (BSN)	2-4 пъти на ден	14-16 дни след излюпване или при изплуване (не е от съществено значение)	19 дни след излюпване, или при изплуване
<i>Pimephales promelas</i> Pimephales promelas	науплии от артемии, храна във вид на люспи замразени артемии	науплии от артемии	науплии от артемии, храна във вид на люспи	2-3 пъти на ден	след като излюпването е 90 %	2 дни след излюпването
<i>Danio rerio</i> Зеброво данио	науплии от артемии, храна във вид на люспи	храна от ларви от търговската мрежа, протозоа ^(б) , белтъци ^(в)	BSN48, храна във вид на люспи	BSN веднъж дневно; храна във вид на люспи два пъти дневно	след като излюпването е 90 %	2 дни след излюпването
<i>Oryzias latipes</i> Японска оризия или Медака	храна във вид на люспи	BSN, храна във вид на люспи (или протозоа или ротатории)	BSN48, храна във вид на люспи (или ротатории)	BSN веднъж дневно; храна във вид на люспи два пъти на ден <u>или</u> храна във вид на люспи и ротатории веднъж на ден	не е приложимо.	6-7 дни след хвърляне на хайвера
Естуарни и Морски:						
<i>Cyprinodon variegatus</i> Cyprinodon variegatus	науплии от артемии, храна във вид на люспи замразени артемии	науплии от артемии (BSN)	BSN48	2-3 пъти на ден	не е приложимо.	1 ден след излюпване/при изплуване
<i>Menidia sp.</i> Атерина	науплии от артемии, храна във вид на люспи	науплии от артемии (BSN)	BSN48	2-3 пъти на ден	не е приложимо	1 ден след излюпване/при изплуване

Легенда:

(*) Храна следва да се дава до насищане. Излишната храна и изпражненията трябва да бъдат отстранявани, когато е необходимо, за да се избегне натрупване на отпадъци замразени артемии замразени артемии полово зрели *Artemia* sp.

науплии от артемии (BSN) науплии от артемии; новоизлюпени
BSN48 науплии от артемии; на възраст 48 часа

^(а) ларвите от жълтъчната торбичка не се нуждаят от храна

^(б) филтрувани от смесена култура

^(в) гранули от ферментационен процес

▼ M7

Допълнение 4

**НЯКОИ ХИМИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПРИЕМЛИВА ВОДА
ЗА РАЗРЕЖДАНЕ**

Компонент	Гранична концентрация
Твърди частици	5 mg/l
Общ органичен въглерод	2 mg/l
Нейонизиран амоняк	1 µg/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
Алуминий	1 µg/l
Арсен	1 µg/l
Хром	1 µg/l
Кобалт	1 µg/l
Мед	1 µg/l
Желязо	1 µg/l
Олово	1 µg/l
Никел	1 µg/l
Цинк	1 µg/l
Кадмий	100 ng/l
Живак	100 ng/l
Сребро	100 ng/l



Допълнение 5

СТАТИСТИЧЕСКИ НАСОКИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА НОЕС

Общи положения

Единицата за анализ е съдът с повторение. Следователно, по отношение на непрекъснатите измервания, като например размера, следва да бъде изчислена средната стойност или медианата за повторението и тези стойности от повторението са данните за анализ. Мощността на използваните статистически тестове трябва да бъде доказана, за предпочитане въз основа на достатъчна база с данни от предходни периоди за всяка лаборатория. Статистическият тест, който ще се използва, следва за всяка крайна точка да предоставя въздействие върху размера, което може да бъде открито със 75-80 % мощност.

Базите данни, налични към момента на разработване на настоящия метод за изпитване, установяват възможната мощност според препоръчаните статистически процедури. Индивидуалната лаборатория следва да докаже способността си да изпълни това изискване за мощност или чрез извършване на свой собствен анализ на мощността, или като докаже, че коефициентът на вариация (CV) за всеки отклик не надвишава 90-ия перцентил от коефициентите на вариация, използвани при разработването на насоките за изпитване. Тези коефициенти на вариация са дадени в таблица 1. Ако за дадено повторение са налични само средни стойности или медиани, коефициентът на вариация в рамките на повторението може да бъде игнориран.

Таблица 1

90-и перцентил на CV за избрани сладководни видове

Животински вид	Отклик	CV между повторенията	CV в рамките на повторението
Дъгова пъстърва	Дължина	17,4	9,8
	Тегло	10,1	28
Pimephales promelas	Дължина	16,9	13,5
	Тегло	11,7	38,7
Зеброво данио	Дължина	43,7	11,7
	Тегло	11,9	32,8

За почти всички статистически тестове, използвани за оценка на лабораторни токсикологични изследвания, представляващите интерес сравнения са на третиранни групи спрямо контроли. Поради това не е целесъобразно да се изисква ANOVA F-тест за значимост преди да се използват тестовете на Дънет или на Уйлямс, нито тест на Кръскал-Уолис за значимост, преди да се използва тест на Йонкхере-Терпстра, тест на Ман-Уитни или тест на Дън (Hochberg and Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al.* 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Тестът на Дънет има вградена настройка за множествени сравнения и използването на F-теста като референтен се отразява неблагоприятно на неговите неверни положителни и неверни отрицателни резултати. По подобен начин, тестовете на Уйлямс със стъпка назад и на Йонкхере-Терпстра, като се използва 0,05 ниво на значимост при всяка стъпка, запазват общо 5 % неверни положителни резултати и използването на F-теста или теста на Кръскал-Уолис като референтен се отразява неблагоприятно на този процент и на мощността на теста. На тестовете на Ман-Уитни и на Дън трябва да се направи корекция за множественост, като се препоръчва корекцията на Бонферони-Холм.

Задълбочено обсъждане за повечето от препоръките за тестване на хипотези и проверка на допусканията, на които се основават тези тестове, се съдържа в OECD (2006), който съдържа също и обширна библиография.

▼ **M7****Третиране на контролите при използване на разтворител**

Ако се използва разтворител, следва да бъдат включени както контрола на вода за разреждане, така и контрола на разтворител. Двете контроли следва да се сравняват за всеки отклик и да се обединят за статистическия анализ, ако не се установи значима разлика между контролите. В противен случай за определянето на NOEC или за оценката на EC_x следва да се използва контролата на разтворител, а контролата на вода за разреждане не се използва. Вж. ограничение в критериите за валидност (точка 7)

За дължина, тегло, дял на излюпени хайверни зърна или смъртност при ларви, или ларви с аномалии, и първи или последен ден на излюпване или изплуване следва да се използва Т-тест или тест на Ман-Уитни за сравняване на контролата на вода за разреждане с контролата на разтворител, при 0,05 ниво на значимост, като се игнорират всички третирани групи. Резултатите от тези тестове следва да се протоколират.

Размери (дължина и тегло)

Стойностите на дължината и теглото на отделната риба могат да са с нормално или log-нормално разпределение. Във всички случаи средните стойности от повторение като тенденция са с нормално разпределение по силата на централната гранична теорема и както е потвърдено от данни от над 100 изследвания, отнасящи се до влияние върху ранни стадии от жизнения цикъл за три сладководни вида. Като алтернатива, когато данните или базите данни за предходни периоди предполагат log-нормално разпределение за стойностите на дължината на отделната риба, могат да се изчислят логаритмите на средните стойности от повторение за отделната риба и след това данните за анализа могат да бъдат антилогаритмите на тези логаритми на средните стойности от повторение.

Данните следва да бъдат оценени за съвместимост с нормалното разпределение и хомогенност на дисперсията. За тази цел следва да се използват остатъците от ANOVA модел, с концентрацията като единствена независима променлива. За визуално определяне могат да бъдат използвани диаграми на разсейване и хистограми или диаграми „стъбло с листа“. Като алтернатива може да се използва формален тест, като тестовите на Шапиро-Уилк или на Андерсън-Дарлинг. Съгласуваността с хомогенност на дисперсията може да бъде оценена визуално чрез оглед на същата диаграма на разсейване, или формално с теста на Левин. Оценката за нормалност и хомогенност на дисперсията е необходима само за параметрични тестове (напр. на Уилямс, Дънет).

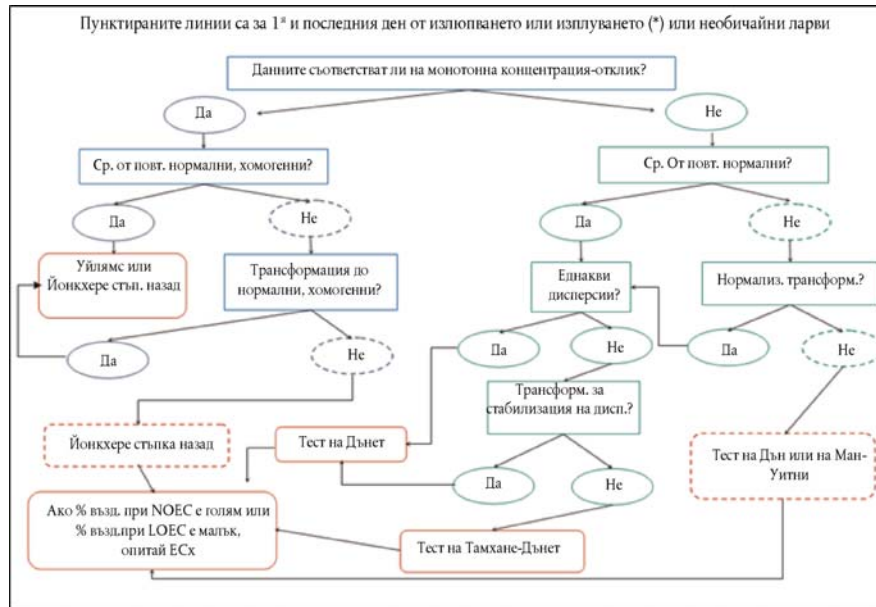
Следва да се обърне внимание на евентуални стойности, силно различаващи се от нормалните, и тяхното въздействие върху анализа. Могат да бъдат използвани тестът на Тюки за стойности, силно различаващи се от нормалните, и визуална инспекция на същите графики на остатъците, описани по-горе. Следва да се припомни, че наблюденията представляват цели повторения, поради което изпускане на стойности, силно различаващи се от нормалните, следва да се извършва само след внимателно разглеждане.

Статистическите тестове, които се възползват от характеристиките на плана на опита и очакванията от биологична гледна точка, са трендовите тестове със стъпка назад, като тест на Уилямс и тест на Йонкхере-Терпстра. Тези тестове допускат монотонна концентрация-отклик и данните трябва да бъдат оценени за съвместимост с това допускане. Това може да бъде направено визуално от диаграма на разсейване на средните от изпитване спрямо изпитваната концентрация. От полза ще е припокриването на тази диаграма на разсейване със сегментирана линейна диаграма, която свързва средните стойности на концентрацията, претеглени с размера на пробата от повторението. Голямо отклонение на тази сегментирана линейна диаграма от монотонността сочи възможна необходимост от използване на тестове, различни от трендовите. Като алтернатива могат да се използват формални тестове. Прост формален тест представлява да се изчислят линейните и квадратните контрасти на концентрационните средни. Ако квадратният контраст е значим, а линейният контраст не е значим, това е показател за възможен проблем, свързан с монотонността, който следва да бъде допълнително оценен от диаграми. Когато нормалността и хомогенността на дисперсията може да представляват проблем, тези контрасти могат да бъдат построени от данни, трансформирани чрез подреждане по рангова скала. Може да се използват алтернативни процедури, като например теста на Бартоломео за монотонността, но те увеличават сложността.

▼ M7

Фигура 2

Схема за NOEC — размери (дължина и тегло)



(*) Тези отклици никога не удовлетворяват допусканията за параметрични анализи или модели

Освен ако данните не са съгласувани с допусканията за тези тестове, NOEC се определя чрез прилагане със стъпка назад на тест на Уилямс или на тест на Йонкхере-Терпстра. OECD (2006) дава подробна информация за тези процедури. За данните, които не са в съответствие с изискванията за трендов тест със стъпка назад, може да се използва тест на Дънет или тест на Тамхане-Дънет (ТЗ), като и двата имат вградена корекция за множественост. Тези тестове допускат нормалност, в случая с теста на Дънет — хомогенност на дисперсията. Когато тези условия не са изпълнени, може да бъде използван непараметричният тест на Дън. OECD (2006) съдържа подробна информация за всички тези тестове. Фигура 2 дава обзор как да се избере тест.

Излюпване на хайверните зърна и преживяване на ларвите

Данните са делът на излюпените хайверни зърна или на ларвите, които преживяват в отделните повторения. Тези дялове трябва да бъдат оценени за дисперсия, по-голяма от очакваната при биномно разпределение, която се среща често, но не е универсална при такива измервания. Схемата във фигура 3 е насока за избор на тест; вж. текста за подробни описания.

Обикновено се използват два теста. Това са $C(\alpha)$ -тестът на Тарон (Tarone, 1979) и хи-квадрат тестовете, всеки от тях се прилага поотделно за всяка изпитвана концентрация. Ако дори само в една изпитвана концентрация се установи дисперсия, по-голяма от очакваната при биномно разпределение, следва да се използват методи, които са съобразени с това.

Формула 1

$C(\alpha)$ -тест на Тарон (Tarone, 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^m \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^m n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^m n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

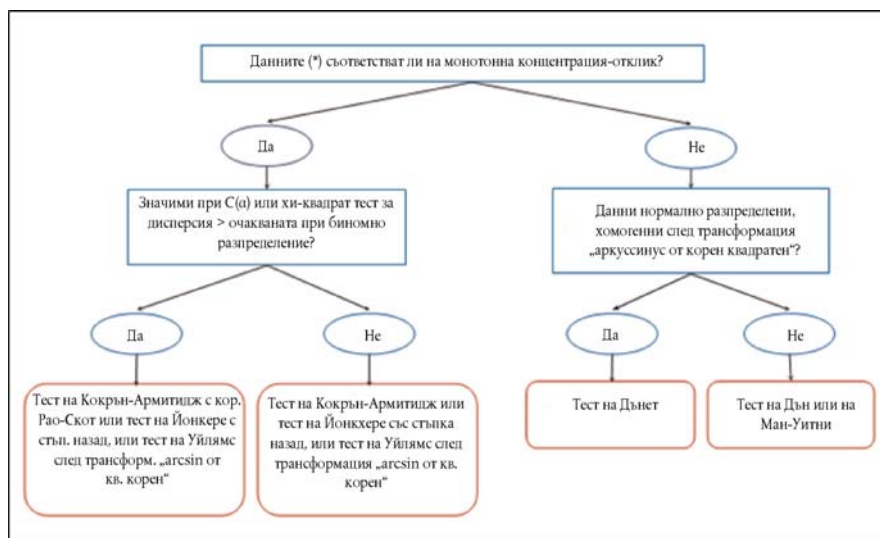
където \hat{p} е средният дял за дадена концентрация, m е броят на съдовете с повторения, n_j е броят на субектите в повторение j , а x_j е броят на представящите отклик субекти в това повторение, например неизлюпените

▼ M7

или мъртвите. Този тест се прилага поотделно за всяка изпитвана концентрация. Този тест може да се разглежда като коригиран хи-квадрат тест, но ограниченото симулиране на мощността, извършено от Тарон, показва че той е с по-голяма мощност от тази на хи-квадрат теста.

Фигура 3

Схема за NOEC — излюпени хайверни зърна и смъртност при ларви



(*) Данните представляват дял в повторение

Когато няма значими доказателства за дисперсия, по-голяма от очакваната при биномно разпределение, може да се използва тестът на Кокрън-Армитидж със стъпка назад. Този тест игнорира повторенията, поради което, когато съществуват такива доказателства, се препоръчва корекцията на Рао-Скот на теста на Кокрън-Армитидж (RSCA), която отчита повторенията, размерите при повторенията и дисперсията, по-голяма от очакваната при биномно разпределение. Алтернативни тестове са тестовете на Уйлямс със стъпка назад и на Йонкере-Терпстра и тестът на Дънет, както е описан във връзка с измерването на размери. Тези тестове се прилагат независимо от това дали има или няма дисперсия, по-голяма от очакваната при биномно разпределение, но са с малко по-малка мощност (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao and Scott 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

Първи или последен ден на излюпване или изплуване

Откликът е цяло число, даващо деня от изпитването, в който се наблюдава посоченото наблюдение за даден съд с повторение. Диапазонът от стойности като цяло е доста ограничен и често има висок процент на свързани стойности, напр. едн и същ първи ден на излюпване се наблюдава във всички контролни повторения и, може би, в една или две ниски концентрации на изпитване. Параметрични тестове, като тези на Уйлямс и на Дънет, не са подходящи за такива данни. Освен в случаите, когато има доказателства за сериозна немонотонност, тестът на Йонкере-Терпстра със стъпка назад е с голяма мощност за откриване на въздействия на изпитвания химикал. В противен случай може да бъде използван тест на Дън.

Аномалии на ларви

Откликът е броят на ларвите с някакви аномалии. Често този отклик е рядко срещан и има някои от същите проблеми като първия ден на излюпване, като също така понякога показва колебания концентрация-отклик. Ако данните поне приблизително следват монотонна концентрационна форма, тестът на Йонкере-Терпстра със стъпка назад е мощен при откриване на въздействия. В противен случай може да бъде използван тест на Дън.

▼ M7

ПОЗОВАВАНИЯ

Agresti, A. (2002); *Categorical Data Analysis*, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, *J. American Statistical Association* 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, *Technometrics* 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics* 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, *Risk Analysis* 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, *Canadian Journal of Statistics* 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); *Multiple Comparison Procedures*, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); *Multiple Comparisons: Theory and Methods*; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, *Biometrika* 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris..

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) — A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) — A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, *Statistics in Medicine* 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. (1988); *Order restricted statistical inference*, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, *Biometrika* 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics* 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics* 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratology, *Biometrics* 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, *Biometrika* 64, 9-14.

▼ M7

Допълнение 6

СТАТИСТИЧЕСКИ НАСОКИ ЗА ОЦЕНКИ ОТ РЕГРЕСИЯ

Общи положения

Наблюденията, използвани за изглаждане на модел, са средните стойности от повторение (дължина и тегло) или дяловете в повторение (излюпени хайверни зърна и смъртност при ларви) (OECD 2006).

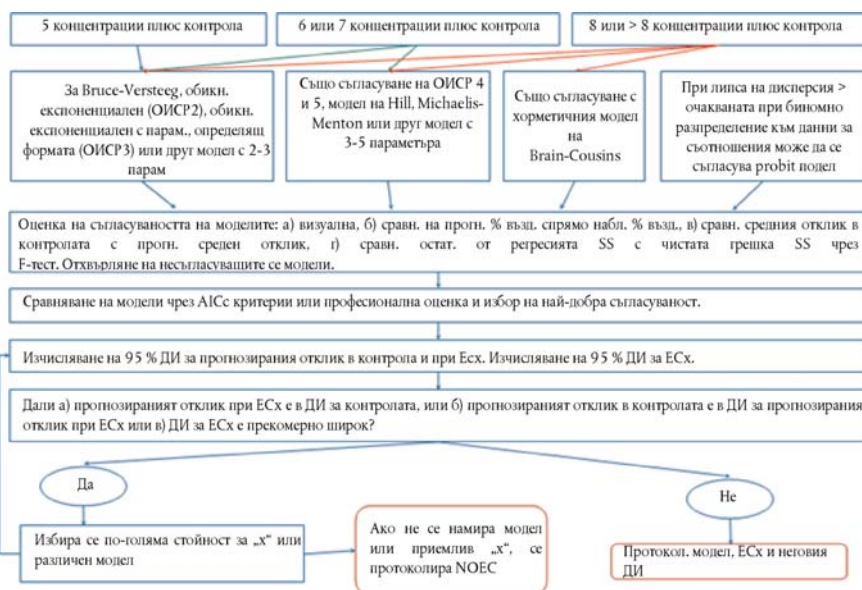
Обикновено се препоръчва използването на претеглена регресия с тегло размерът на извадката от повторението. Възможни са други схеми за претегляне, като претегляне от прогнозна средна стойност на отклика, или комбинация от това и размера на извадката от повторението. Претегляне чрез реципрочната стойност на дисперсията в извадката при определена концентрация не се препоръчва (Bunke *et al.* 1999, Seber and Wild, 2003, Motulsky and Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Всяка трансформация на отклиците преди анализа следва да запази независимостта на наблюденията и ЕСх и нейните доверителни граници следва да бъдат изразени в оригиналните мерни единици, а не в преобразувани единици. Например, 20 % изменение в логаритъма на дължината не е еквивалентно на 20 % изменение в дължината (Lyles *et al.* 2008, Draper and Smith 1999).

Схемата във фигура 4 представя преглед на оценките на ЕСх. Подробностите са описани в текста по-долу.

Фигура 4

Схема за оценка на ЕСх за средна дължина, средно тегло или дял на излюпени хайверни зърна или смъртност от повторение, вж. текста за повече подробности



Съображения относно излюпени хайверни зърна и смъртност при ларви

При излюпените хайверни зърна и смъртността при ларви като цяло най-добро е изглаждането с модел с намаляване, освен ако не се изглажда с probit модел, както е описано по-долу. Т.е. следва да се моделира делът на хайверните зърна, които не се излюпват, или ларвите, които умират. Причината за това е, че ЕСх означава концентрация, при която е налице изменение, равно на x % от средната стойност на отклика в контролата. Ако в контролата има 5 % хайверни зърна, които не се излюпват, и се моделира липсата на излюпване, тогава ЕС20 означава концентрация, при която е налице изменение, равно на 20 % от 5-те % хайверни зърна в контролата, които не се излюпват, и това е изменение от $0,2 \cdot 0,05 = 0,01$, или 1 процентен

▼ M7

пункт, до 6 % хайверни зърна, които не се излюпват. Такова малко изменение не може да бъде оценено по никакъв смислен начин от наличните данни и не е с важно биологично значение. Докато ако се моделира делът на излюпените хайверни зърна, делът между контролите ще бъде 95 % в този пример и 20 % намаление от средната стойност в контролите би било изменение на $0,95 * 0,2 = 0,18$, т.е. от 95 % излюпени на 77 % (= 95-18) излюпени и концентрацията, водеща до такова въздействие, може да бъде оценена и е вероятно да е от по-голям интерес. Това не е въпрос с измерванията на размера, въпреки че неблагоприятните въздействия върху размера по принцип означават намаляване на размера.

Модели за размер (дължина или тегло) и процент на излюпване или преживяване на ларвите.

С изключение на хорметичния модел на Brain-Cousens, всички тези модели са описани и препоръчвани в OECD (2006). Т.нар. ОИСП 2-5 също се обсъждат при опити за екоотоксичност в Slob (2002). Съществуват, разбира се, много други модели, които биха могли да бъдат полезни. В Bunke *et al.* (1999) са изброени множество модели, които не са включени тук, и са дадени многобройни препратки към други модели. Изброените по-долу се предлагат като особено подходящи и широко използвани при опити за екоотоксичност.

С 5 концентрации на изпитване, плюс контрола

- Bruce-Versteeg
- Обикновен експоненциален (ОИСП 2)
- Експоненциален с параметър, определящ формата (ОИСП 3)
- Обикновен експоненциален с долна граница (ОИСП 4)

С 6 концентрации на изпитване, плюс контрола

- Експоненциален с параметър, определящ формата, и долна граница (ОИСП 5)
- Michaelis-Menten
- Hill

Когато има видими следи от хормезис (малко вероятно при процента на излюпване или преживяването на ларвите, но понякога се наблюдава при наблюденията на размерите)

- хорметичен Brain-Cousens; Brain and Cousens (1989)

Алтернативни модели за процента на неизлюпване и смъртността на ларвите

- Моделите с увеличаване за тези отклици могат да бъдат пригодени чрез probit (или логистични) модели, ако липсват доказателства за дисперсия, по-голяма от очакваната при биномно разпределение, и честотата в контролите е оценена в пригодността на модела. Това не е предпочитаният метод, тъй като той третира индивида, а не повторението, като единица за анализ (Morgan 1992, O'Hara Hines and Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Съответствие (goodness of fit) на единствен модел

- Визуално се сравняват наблюдаваното и прогнозираното процентно намаление при всяка изпитвана концентрация (Motulsky and Christopoulos 2004, Draper and Smith 1999).
- Сравнява се средният квадрат на грешката от регресията със средния квадрат на чистата грешка, с помощта на F-тест (Draper and Smith 1999).
- Проверява се дали всички компоненти на модел се различават значимо от нула (т.е. определя се дали всички компоненти на модела са важни (Motulsky and Christopoulos 2004).

▼ **M7**

- Точки с остатъците от регресията спрямо изпитваната концентрация, евентуално върху скала $\log(\text{конц.})$. Не следва да има никакъв модел за тази диаграма; точките следва да бъдат случайно разпръснати около хоризонтална линия на височина нула.
- Данните трябва да бъдат оценени за нормалност и хомогенност на дисперсията по същия начин, както е посочено в допълнение 5.
- Освен това нормалността на остатъците в регресионния модел следва да бъде оценена, като се използват същите методи, посочени в допълнение 5 за остатъците от ANOVA

Сравняване на модели

- Използват се коригираните информационни критерии на Акайке (AICс). По-малките стойности на AICс означават по-добра съгласуваност и ако $AICс(B) - AICс(A) \geq 10$, модел А почти със сигурност е по-добър от модел В (Motulsky and Christopoulos (2004).
- Двамата модела се сравняват визуално по отношение на тяхната степен на изпълнение на горепосочените критерии за единствен модел.
- Препоръчва се прилагането на принципа на простотата, съгласно който се използва най-простият модел, който се съгласува сравнително добре с данните (Ratkowsky 1993, Lyles et.al 2008).

Качество на оценката на EC_x

Доверителният интервал (CI) за EC_x следва да не бъде прекомерно широк. Необходима е статистическа преценка при вземането на решение за това колко широк може да е доверителният интервал, така че стойността EC_x да запази полезността си. Симулации на регресионни модели, съгласувани с данни за излюпването на хайверни зърна и за размерите показват, че около 75 % от доверителните интервали за EC_x ($x = 10, 20$ или 30) обхващат не повече от две концентрации на изпитване. Това дава общи насоки относно какво е приемливо, и практически насоки относно какво е постижимо. Много автори твърдят, че е необходимо да се протоколират доверителните интервали за всички параметри на модела, и че широките доверителни интервали за параметрите на модела показват неприемливи модели (Ott and Longnecker 2008, Alvord and Rossio 1993, Motulsky and Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber and Wild 2003, Bunke *et al.* 1999, Environment Canada 2005).

CI за EC_x (или всеки друг параметър на модела) следва да не съдържа нула (Motulsky and Christopoulos 2004). В регресионните модели той е еквивалентен на минималната значима разлика, която често се посочва в подходите с тестване на хипотези (напр. Wang *et al.* 2000). Той също така съответства на това доверителният интервал за средните отклици при LOEC да не съдържа средната стойност на контролата. Следва да се зададе въпросът дали оценките на параметъра са научно достоверни. Например ако доверителният интервал за y_0 е $\pm 20\%$, оценката за EC_{10} не е достоверна. Ако моделът предвижда 20% въздействие при концентрация със стойност С и наблюдаваното максимално въздействие при тази и при по-ниски стойности на концентрацията е 10% , тогава EC_{20} не е достоверна (Motulsky and Christopoulos 2004, Wang *et al.* 2000, Environment Canada 2005).

EC_x следва да не изисква екстраполация извън обхвата от положителни концентрации (Draper and Smith 1999, OECD 2006). Например, обща насока за стойността на EC_x може да е, че тя не трябва превишава около 25% под най-ниската изпитвана концентрация, или над най-високата изпитвана концентрация.

ПОЗОВАВАНИЯ

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, *Journal of Immunological Methods* 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed res.* 29: 93-96.

▼ M7

- Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.
- Collett, D. (2002); *Modelling Binary Data*, second edition, Chapman and Hall, London.
- Collett, D. (2003); *Modelling Survival Data in Medical Research*, second edition, Chapman and Hall, London.
- Draper, N.R. and Smith, H. (1999); *Applied Regression Analysis*, third edition. New York: John Wiley & Sons.
- Environment Canada (2005); *Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests*, Report EPS 1/RM/46
- Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); *Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples*, Springer Series in Statistics, New York.
- Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878–886.
- Morgan, B.J.T. (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, London.
- Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*, Oxford University Press, USA.
- O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121
- OECD (2006); *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application*. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.
- Ott, R.L., M.T. Longnecker, *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA
- Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, *Journal of Industrial Microbiology* 12, 195-199.
- Seber, G.A.F., C.J. Wild, *Nonlinear Regression*, Wiley, 2003
- Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66, 298-312
- Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.

▼ M7

B.48. КРАТКОСРОЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО ПРИ РИБИ

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 229 (2012). Необходимостта от разработване и валидиране на изследване, позволяващо откриване на ендокринно активни химикали, произлиза от загрижеността, че нивата на химикали в околната среда могат да причинят неблагоприятни въздействия както за хората, така и за дивата флора и фауна, поради взаимодействието на тези химикали с ендокринната система. През 1998 г. ОИСП стартира с висок приоритет дейност по преразглеждане на съществуващите Насоки за изпитване и по разработване на нови Насоки за изпитване за скрининг и изпитвания за потенциални нарушения на функциите на ендокринната система. Един от елементите на дейността бе да се разработи насока за изпитване за скрининг на химикали, активни в ендокринната система на риби. Краткосрочното изследване на размножаването при риби премина през обширна програма за валидиране, състояща се от междулабораторни изследвания с подбрани химикали, за доказване уместността и надеждността на изследването за откриване на химикали, които оказват въздействие върху размножаването при риби чрез различни механизми, в това число ендокринни механизми (1, 2, 3, 4, 5). Всички крайни точки на насоките за изпитване на ОИСП са валидирани за *Pimephales promelas*, и поднабор от крайни точки е валидиран за японската оризия (т.е. вителогенин и вторични полови белези) и за зебровото данио (т.е. вителогенин). Работата по валидирането е преминала през партньорска проверка от група от експерти, назначени от националните координатори на Програмата на ОИСП за насоки за изпитване (6) частично, и от независима група експерти по поръчка на Американската агенция за защита на околната среда (29). Изследването не е предназначено за идентифициране на специфични механизми на хормонални нарушения, тъй като изпитваните животни имат интактна хипоталамус-хипофиза-гонадна ос (ХХГ ос), която може да реагира на химикали, оказващи въздействие върху ХХГ оста на различни равнища.
2. Настоящият метод за изпитване описва скринингово изследване *in vivo*, при което полово зрели мъжки и хвърлящи хайвер женски индивиди се държат заедно и се експонират на даден химикал през ограничена част от жизнения им цикъл (21 дни). При приключване на 21-дневния период на експозиция като крайни точки се измерват два биомаркера в мъжки и женски индивиди, в качеството им на показатели за ендокринна активност на изпитвания химикал; тези крайни точки са вителогенин и вторични полови белези. Вителогенин се измерва в *Pimephales promelas*, японска оризия и зеброво данио, докато вторични полови белези се измерват в *Pimephales promelas* и японска оризия. Освен това плодовитостта в количествено отношение се наблюдава ежедневно по време на изпитването. Гонадите също се запазват и хистопатологията може да бъде оценена за определяне на репродуктивното здраве на изпитваните животни и за увеличаване на тежестта на доказателствата от други крайни точки.
3. Това биологично изследване служи като скринингово изследване *in vivo* на репродукцията и неговото прилагане следва да се разглежда в контекста на „Концептуалната рамка на ОИСП за изпитване и оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система“ (30). В тази концептуална рамка краткосрочното изследване на размножаването при риби е предложено в равнище 3 като изследване *in vivo*, предоставящо данни относно избран(и) ендокринен(ни) механизъм(и)/път(ища).

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

4. Вителогенинът (VTG) обикновено се произвежда от черния дроб на женски яйценосни гръбначни животни в отговор на циркулиращия ендогенен естроген. Той е прекурсор на белтъците в яйчния жълтък и след образуването си в черния дроб преминава в кръвообращението, откъдето стига до яйчника и там се модифицира в образуващия се хайвер. Вителогенинът е почти неоткриваем в плазмата на незрели женски и мъжки риби поради липса на достатъчно циркулиращ естроген; черният дроб обаче може да синтезира и секретира VTG в отговор на външно естрогенно стимулиране.

▼ M7

5. Измерването на VTG служи за откриване на химикали с различни естрогенни механизми на действие. Откриването на химикали с естрогенно действие е възможно чрез измерване на индуцирането на VTG в мъжки риби, и е много добре документирано в научната литература, преминала през партньорска проверка (напр. (7)). Индуцирането на VTG е доказано и след експозиция на андрогени, които могат да се ароматизират (8, 9). Намаляването на равнището на циркулиращ естроген в женските животни, например посредством инхибиране на ароматазата, превръщаща ендегенния андроген в природния естроген 17 β -естрадиол, води до намаляване на нивото на VTG, което се използва за откриване на химикали, притежаващи свойства на инхибитори по отношение на ароматазата (10, 11). Биологичната значимост на отговора с VTG след естрогенно/ароматазно инхибиране е установена и е широко документирана. Възможно е обаче образването на VTG в женски животни да е също така повлияно от обща токсичност и начини на токсично действие, различни от ендокринните, напр. хепатотоксичност.
6. Успешно са разработени и стандартизирани за рутинна употреба няколко метода за измерване. Такъв е случаят със специфичните за отделните видове ензимно-свързани имуносорбентни анализи (ELISA), използващи имунохимия за количествено определяне на получавания VTG в малки проби от кръв или черен дроб, взети от отделните риби (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Проби за измерване на VTG се вземат от кръв от *Pimephales promelas*, кръв или хомогенат глава/опашка от зеброво данио и черен дроб от японска оризия. При японската оризия е налице добра корелация между VTG, измерен от кръв и от черен дроб (19). В допълнение 6 са дадени препоръчителните процедури за събирането на проби за анализ на VTG. Комплектите за измерване на VTG са широко разпространени; такива комплекти следва да се основават на валидиран специфичен за отделните видове ELISA метод.
7. Вторичните полови белези в мъжки екземпляри от някои видове риби са видими външно, количествено определяеми и чувствителни към нивата на циркулиращите ендегенни андрогени; такъв е случаят с *Pimephales promelas* и японската оризия, но не и със зебровото данио, което не притежава количествено определяеми вторични полови белези. Женските запазват способността си за развиване на мъжки вторични полови белези, когато са експонирани на андрогенни химикали във вода. В научната литература са на разположение няколко проучвания, документиращи този тип отговор в *Pimephales promelas* (20) и японската оризия (21). Намаляването при вторични полови белези у мъжките индивиди следва да се тълкува внимателно поради неголямата статистическата мощност, и следва да се основава на експертна оценка и на тежестта на доказателствата. Съществуват ограничения за използването на зебровото данио в настоящото изследване поради липсата на количествено определяеми вторични полови белези, реагиращи на андрогенно активни химикали.
8. При *Pimephales promelas* основният показател за външна андрогенна експозиция е броят на размножителните туберкули, разположени по муцуната на женския индивид. При оризията броят на папиларните израстъци представлява основният маркер на екзогенна експозиция на андрогенни химикали при женските риби. Допълнение 5А и допълнение 5Б посочват препоръчаните процедури, които трябва да се спазват при оценката на половите белези съответно при *Pimephales promelas* и оризията.
9. 21-дневното изследване на риби включва количествена оценка на получаването на хайверни зърна и запазване на гонадите за незадължително хистопатологично изследване. Някои регулаторни органи могат да изискват тази допълнителна крайна точка за по-пълна оценка на репродуктивното здраве на изпитваните животни, или в случаи, когато при VTG и вторичните полови характеристики не е имало отклик на експозицията на химикала. Въпреки че някои крайни точки могат да са с висока диагностична стойност (напр. индуциране на VTG в мъжки и образуване на туберкули в женски), не всички крайни точки (напр. плодовитост и гонадна хистопатология) в изследването са предназначени за недвусмислено идентифициране на специфични клетъчни механизми на действие. Обратно, наборът от крайни точки, взети заедно, позволява да се правят изводи по отношение на възможни

▼ M7

ендокринни смущения и по този начин да се предоставят насоки за по-нататъшно изпитване. Въпреки че не е ендокринно специфична, плодовитостта, поради нейната доказана чувствителност към известните ендокринно активни химикали (5), е важна крайна точка за включване, тъй като когато тя и други крайни точки не са повлияни, това дава по-голяма увереност, че дадено съединение е малко вероятно да е ендокринно активно. Въпреки това, когато е засегната, плодовитостта ще допринесе значително за изводите по отношение на тежестта на доказателствата. Насоки за тълкуване на данните и приемането на резултатите от изпитването са предоставени по-нататък в настоящия метод за изпитване.

10. Определенията, използвани за този метод за изпитване, са дадени в Допълнение 1.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

11. В рамките на изследването мъжки и женски риби, способни на размножаване, се експонират заедно в съдове за изпитване. Техният статус на полово зрели и способни на размножаване индивиди позволява ясното разграничаване на половете и следователно дава възможност за свързан с пола анализ на всяка крайна точка, и гарантира тяхната чувствителност към външни химикали. При завършване на изпитването полът се потвърждава с макроскопско изследване на гонадите след отваряне на корема с ножици. Преглед на съответните условия на биологичното изследване е даден в допълнение 2. Изследването обикновено започва с риби, пробовзети от популация, която е в състояние на хвърляне на хайвер; застаряващи индивиди не следва да се използват. Указания относно възрастта на рибите и репродуктивния им статус са дадени в раздела за подбора на риби. Изпитването се провежда, като се използват три концентрации на експозиция на химикал, както и контрола на вода и, ако е необходимо, контрола на разтворител. За зебровото данио се използват два съда или повторения на третиране (всеки съд съдържа 5 мъжки и 5 женски). За *Pimephales promelas* се използват четири съда или повторения на третиране (всеки съд съдържа 2 мъжки и 4 женски). Това е така с цел приспособяване към териториалното поведение на мъжките при *Pimephales promelas*, като се поддържа достатъчна мощност на изследването. За оризията се използват четири съда или повторения на третиране (всеки съд съдържа 3 мъжки и 3 женски). Експозицията се провежда в продължение на 21 дни и вземане на проби от риби се извършва на 21-ия ден от експозицията. Плодовитостта в количествено отношение се наблюдава ежедневно.
12. При вземането на проби на 21-ия ден от експозицията животните се умъртвяват по хуманен начин. Вторичните полови белези се измерват при *Pimephales promelas* и японската оризия (виж допълнение 5A и допълнение 5B); кръвни проби за определяне на VTG се вземат от зебровото данио и *Pimephales promelas*, като алтернатива хомогенат глава/опашка може да се вземе от зебровото данио за определяне на VTG (допълнение 6); черен дроб за анализа на VTG се взема от оризията (допълнение 6). Гонадите се фиксират или цели, или след дисекция, за евентуална хистопатологична оценка (22).

КРИТЕРИИ ЗА ПРИЕМАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

13. За да са приемливи резултатите от изпитването, се прилагат следните условия:
- смъртността в контролите на вода (или на разтворител) не трябва да надвишава 10 % в края на периода на експозиция;
 - концентрацията на разтворен кислород трябва да бъде най-малко 60 от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух (ASV) по време на периода на експозиция;
 - температурата на водата трябва да се различава с не повече от $\pm 1,5$ °C между съдовете за изпитване по всяко време на периода на експозиция, и се поддържа в диапазон от 2 °C в рамките на температурните диапазони, посочени за изпитваните видове (допълнение 2).
 - следва да бъдат на разположение доказателства, че концентрацията на изпитвания химикал в разтвора е била задоволително поддържана в рамките на ± 20 % от усреднените измерени стойности;

▼ **M7**

— доказателства, че рибата активно хвърля хайвер във всички повторения преди да започне експозицията на химикала, и в повторенията с контроли по време на изпитването.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**Апаратура**

14. Обикновено лабораторно оборудване и специално следното:
 - a. устройства за измерване на съдържанието на кислород и рН-метри;
 - b. оборудване за определяне твърдост и алкалност на водата;
 - v. подходяща апаратура за контрол на температурата и за предпочитане продължителен мониторинг;
 - г. съдове, направени от химически инертни материали и с подходящ капацитет по отношение на препоръчителната гъстота на зареждане и отглеждане (вж. допълнение 2);
 - д. субстрат за хвърляне на хайвер за *Pimephales promelas* и зебровото данио, допълнение 4 съдържа необходимите подробности;
 - e. подходящи точни везни (т.е. точност до $\pm 0,5$ mg).

Вода

15. Всяка вода, в която изпитваният вид показва съответните признаци за дългосрочно преживяване и растеж, може да се използва като вода за изпитването. Необходимо е постоянно качество на водата по време на изпитването. Стойността на рН на водата следва да е от 6,5 до 8,5, но по време на дадено изпитване трябва да е в диапазон $\pm 0,5$ рН единици. За да се гарантира, че водата за разреждане няма да повлияе неправилно върху резултата от изпитването (например чрез образуване на комплекс с изпитвания химикал), пробите за анализ следва да се вземат на интервали. Следва да се правят измервания за тежки метали (например Cu, Pb, Zn, Hg, Cd и Ni), основни аниони и катиони (например Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- и SO_4^{2-}), пестициди (например общо органофосфорни и общо органохлорни пестициди), общ органичен въглерод и суспендирани частици, например на всеки три месеца, когато се знае, че водата за разреждане има относително постоянно качество. Ако е доказано, че качеството на водата е постоянно най-малко в продължение на една година, определянията могат да се правят по-рядко и могат да се увеличат интервалите (например на всеки шест месеца). Някои от химичните характеристики на приемливата вода за разреждане са изброени в допълнение 3.

Разтвори за изпитване

16. Разтворите за изпитване при избраните концентрации се приготвят чрез разреждане на изходен разтвор. Изходният разтвор се приготвя за предпочитане чрез просто смесване и разбъркване на изпитвания химикал във водата за разреждане с помощта на механични средства (например разклащане или ултрасонификация). За постигане на подходящо концентриран изходен разтвор могат да се използват колони за насищане (колони за разтворимост). Използването на разтворител за носител не е препоръчително. Независимо от това, в случай че е необходим разтворител, успоредно следва да се проведе изпитване на контрола на разтворител, при същата концентрация на разтворител, като тази при третираната с химикала. За трудно разтворими изпитвани химикали е възможно разтворителят да бъде технически най-доброто решение; следва да се консултира Ръководството на ОИСП с насоки за изпитване за токсичност във водна среда на трудни вещества и смеси (23). Изборът на разтворител се определя в зависимост от химичните свойства на веществото или сместа. Ръководството на ОИСП препоръчва максимум от 100 µl/l, което следва да се спазва. Независимо от това неотдавнашен преглед (24) подчерта допълнителни проблеми при използването на разтворители за изпитване на ендокринна активност. Поради това се препоръчва концентрацията на разтворителя, ако е необходим, да бъде сведена до минимум, когато това е технически осъществимо (в зависимост от физичните и химичните свойства на изпитвания химикал).

▼ M7

17. Използва се проточна система за изпитване. Такава система постоянно подава и разрежда изходен разтвор на изпитвания химикал (например система с измерваща помпа, пропорционално разреждащо устройство, сатуратор), за да се подават серии от концентрации към камерите за изпитване. Параметрите на потока на изходния разтвор и водата за разреждане следва да се проверяват на интервали, за предпочитане всеки ден по време на извършването на изпитването, и през това време не следва да се променят с повече от 10 %. Трябва внимателно да се избягва използването на нискокачествени пластмасови тръби или други материали, които могат да съдържат биологично активни химикали. При избора на материали за проточната система трябва да бъде взета под внимание възможна адсорбция на изпитвания химикал върху този материал.

Отглеждане на рибата

18. Рибата за изпитването следва да се избира от лабораторна популация, за предпочитане от един и същ рибен запас, която е била аклиматизирана в продължение на поне две седмици преди изпитването, при условия, свързани с качеството на водата и осветлението, подобни на тези, използвани при изпитването. Важно е скоростта на зареждане и гъстотата на отглеждане (за определения, виж допълнение 1) да са подходящи за използваните за изпитването видове (вж. допълнение 2).
19. След 48-часов период на свикване се отчита смъртността и се прилагат следните критерии:
- при смъртност, по-голяма от 10 % от популацията за седем дни: отхвърля се цялата партида;
 - при смъртност между 5 % и 10 % от популацията: аклиматизация за нови седем дни; ако смъртността е повече от 5 % през вторите седем дни, се отхвърля цялата партида;
 - при смъртност по-малко от 5 % от популацията за седем дни: партидата се приема.
20. По време на аклиматизационния период, в периода преди експозицията или по време на периода на експозиция рибата не следва да бъде лекувана от заболявания.

Период преди експозицията и подбор на риби

21. Препоръчва се едноседмичен до двуседмичен период преди експозицията, в който животните се поставят в съдове, подобни на съдовете при действителното изпитване. Рибите следва да бъдат хранени *ad libitum* през време на периода на отглеждане и по време на фазата на експозиция. Фазата на експозиция започва с полово диморфни възрастни риби от лабораторна доставка на зрели животни, способни на размножение (напр. с ясно видими вторични полови белези що се отнася до *Pimephales promelas* и японската оризия) и активно хвърлящи хайвер. Само за общ ориентир (и без да се разглежда изолирано от наблюдаването на настоящия репродуктивен статус на дадена партида от риби), *Pimephales promelas* трябва да бъде на възраст приблизително 20 (\pm 2) седмици, като се приема, че рибите от този вид са били отглеждани при 25 ± 2 °C през жизнения им цикъл. Японската оризия трябва да бъде на възраст приблизително 16 (\pm 2) седмици, като се приема, че рибите от този вид са били отглеждани при 25 ± 2 °C през жизнения им цикъл. Зебровото данио трябва да бъде на възраст приблизително 16 (\pm 2) седмици, като се приема, че рибите от този вид са били отглеждани при 26 ± 2 °C през жизнения им цикъл. Получаването на хайверни зърна следва да се оценява ежедневно по време на фазата преди експозицията. Препоръчва се хвърлянето на хайвера да се наблюдава във всички съдове с повторения преди включване във фазата на експозиция от изследването. На този етап не могат да бъдат дадени количествени насоки относно желателното ежедневно получаване на хайверни зърна, но е сравнително обичайно да се наблюдава средно хвърляне на > 10 хайверни зърна/женска/ден за всеки вид. Следва да се използва рандомизиран блоков план в съответствие с получените хайверни зърна, за разпределяне в повторенията на различните опитни равнища, за да се осигури балансирано разпределяне при повторенията.

▼ **M7****ПЛАНИРАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**

22. Използват се три концентрации на изпитвания химикал, една контрола (вода) и, ако е необходимо, една контрола на разтворител. Данните могат да бъдат анализирани, за да се определят статистически значими разлики между отклиците в третираните и контролите. Тези анализи ще дадат информация дали вместо за употреба при оценка на риска, не се изисква по-нататъшно по-дългосрочно изпитване за неблагоприятни последици (а именно преживяване, развитие, растеж и размножение) (25).
23. За зебровото данио, в ден 21 на опита се пробовземат мъжки и женски животни от всяко ниво на третиране (5 мъжки и 5 женски животни във всяко от двете повторения) и от контролата(ите), за измерване на VTG. За оризията, в ден 21 на опита се пробовземат мъжки и женски животни от всяко ниво на третиране (3 мъжки и 3 женски животни във всяко от четирите повторения) и от контролата(ите), за измерване на VTG и вторични полови белези. За *Pimephales promelas* в ден 21 на опита се пробовземат мъжки и женски животни (2 мъжки и 4 женски животни във всяко от четирите повторения) и от контролата(ите), за измерване на VTG и вторични полови белези. Изисква се количествена оценка на плодовитостта, и гонадните тъкани се фиксират изцяло или им се извършва дисекция за евентуална хистопатологичната оценка, ако се изисква.

Избор на концентрации на изпитване

24. За целите на това изпитване най-високата изпитвана концентрация трябва да се определя от максимално поносимата концентрация (МПК), определена при изпитване за определяне на обхвата, или от други данни за токсичност, или 10 mg/l, или максималната разтворимост във вода, в зависимост от това коя е най-ниска. МПК се определя като най-високата изпитвана концентрация на химикала, която води до по-малко от 10 % смъртност. При използването на този подход се допуска, че са налице емпирични данни за смъртността от остра и друга токсичност, от които може да се оцени МПК. Оценката на МПК може да бъде неточна и обикновено се изисква определена професионална преценка.
25. Изискват се три изпитвани концентрации, раздалечени на равни интервали една от друга с кратност, която не надвишава 10, и контрола на вода за разреждане (както и контрола на разтворител, ако е необходимо). Препоръчва се раздалечаване с кратност между 3,2 и 10.

ПРОЦЕДУРА**Подбор и измерване теглото на изпитваните риби**

26. Важно е варирането в теглото на рибите в началото на изпитването да се сведе до минимум. Подходящи диапазони на размерите за различните видове, които се препоръчват за използване в настоящото изпитване, са дадени в допълнение 2. За цялата партида от риби, използвани в изпитването, стойностите на индивидуалните тегла в началото на изпитването следва да се запазят в $\pm 20\%$ от средноаритметичното тегло на рибите от същия пол. Препоръчва се да се измерва и теглото на подпроба от рибния запас преди изпитването с цел да се оцени средното тегло.

Условия на експозиция*Продължителност*

27. Продължителността на изпитването е 21 дни, след период преди експозицията. Препоръчаният период преди експозицията е една до две седмици.

Хранене

28. Рибите следва да бъдат хранени *ad libitum* с подходяща храна (допълнение 2) в достатъчно количество за поддържане на телесното състояние. Следва да се полагат грижи за избягване на развитието на микроби и на помътняване на водата. Като обща насока дневната

▼ M7

порция може да бъде разделена на две или три равни части за многократно ежедневна хранене, с поне три часа между всяко хранене. Еднократна по-голяма порция е приемлива, особено за съботите и неделите. Даването на храна се прекратява 12 часа преди пробовземането/аутопсията.

29. Храната за риби следва да бъде оценявана за наличието на замърсители, като например органохлорни пестициди, полициклични ароматни въглеродороди (РАН), полихлорирани бифенили (РСВ). Храна с повишени нива на фитоестрогени, които биха нарушили отклика при изследването с познати естрогенни агонисти (напр. 17 β -естрадиол), следва да се избягва.
30. Неконсумираната храна и фекалните отпадъци следва да се отстраняват от съдовете за изпитване най-малко два пъти седмично, напр. чрез внимателно почистване на дъното на всеки съд, с използване на сифон.

Светлина и температура

31. Продължителността на излагане на светлина и температурата на водата следва да са подходящи за изпитваните видове (допълнение 2).

Честота на аналитичните определяния и измервания

32. Преди започване на периода на експозиция следва да бъде гарантирано правилното функциониране на системата за доставяне на химикала. Всички необходими методи за анализ следва да бъдат установени, включително с достатъчно информация за стабилността на химикала в системата за изпитване. По време на изпитването концентрациите на изпитвания химикал се определят през постоянни интервали, както следва: дебитът на водата за разреждане и на изходния разтвор на токсичния химикал следва да се проверяват, за предпочитане ежедневно, но като минимум два пъти седмично и през време на изпитването не следва да се променят с повече от 10 %. Препоръчва се действителните концентрации на изпитвания химикал да се измерват във всички съдове в началото на изпитването и след това на интервали от една седмица.
33. Препоръчва се резултатите да се основават на измерени концентрации. Обаче ако концентрацията на изпитвания химикал в разтвора е поддържана на задоволително ниво в рамките на ± 20 % от номиналната концентрация по време на изпитването, тогава резултатите могат да се основават или на номиналната, или на измерената стойност.
34. Възможно е да се наложи филтруване (напр. с използване на отвори с размер 0,45 μm) или центрофугиране на пробите. Ако е необходимо, центрофугирането се препоръчва като процедура. Обаче в случай че изпитваният материал не се адсорбира върху филтрите, филтруването също може да е приемливо.
35. По време на изпитването разтвореният кислород, температурата и рН следва да бъдат измервани във всеки съд за изпитване най-малко веднъж седмично. Общата твърдост и алкалността следва да се измерват в контролите и в един съд с най-висока концентрация най-малко веднъж седмично. За предпочитане е температурата да се наблюдава непрекъснато най-малко в един съд за изпитване.

Наблюдения

36. По време на изследването или при приключването му се оценяват редица общи (напр. преживяване) и биологични отклици (напр. нива на VTG). Изисква се ежедневно наблюдаване на плодовитостта в количествено отношение. Измерването и оценката на тези крайни точки и ползата от тях са описани по-долу.

Преживяване

37. Рибите следва да се преглеждат всеки ден през периода на изпитването и всякаква смъртност следва да се записва, а мъртвите екземпляри да се отстраняват колкото е възможно по-бързо. Мъртвите риби не следва да се заменят нито в съдовете с контроли, нито в съдове за третиране. Полът на рибите, които умират по време на изпитването, трябва да се определи чрез макроскопска оценка на гонадите.

▼ M7

Поведение и външен вид

38. Всяко необичайно поведение (в сравнение с контролите) трябва да бъде отбелязвано; това може да включва признаци на обща токсичност, включително хипервентилация, некоординирано плуване, загуба на равновесие, и нетипично състояние на покой или нетипично поведение при хранене. Освен това следва да бъдат отбелязвани и външните аномалии (като кръвоизлив, обезцветяване). Такива признаци на токсичност следва да се разглеждат внимателно при интерпретирането на данните, тъй като те могат да сочат концентрации, при които биомаркерите за ендокринна активност не са надеждни. Такива наблюдения на поведението могат също да предоставят полезна качествена информация за потенциалните бъдещи изисквания за изпитвания на риби. Така например, териториалната агресивност при нормални мъжки или при женски, придобили мъжки вторични полови белези, е наблюдавана при *Pimephales promelas* при андрогенна експозиция; при зебровото данио характерното поведение при чифтосване и хвърляне на хайвера, проявяващо се непосредствено след изгрев, се ограничава или се възпрепятства от естрогенна или антиандрогенна експозиция.
39. Тъй като някои аспекти на външния вид (предимно цветът) могат да се променят бързо при боравенето, важно е качествените наблюдения да бъдат извършени преди отстраняването на животните от системата за изпитване. От досегашния опит с *Pimephales promelas* се предполага, че някои ендокринно активни химикали може първоначално да предизвикат промени в следните външни характеристики: оцветяване на тялото (светло или тъмно), начини на оцветяване (наличие на вертикални ленти) и форма на тялото (главата и гръдната област). Поради това наблюденията на външния вид на рибите следва да бъдат правени по време на изпитването и при приключване на изследването

Плодовитост

40. Ежедневните количествени наблюдения на хвърлянето на хайвера следва да се записват на основа повторение. Получените хайверни зърна следва да бъдат записвани като брой хайверни зърна/преживяла женска/ден на основа повторение. Хайверните зърна ще бъдат отстранявани ежедневно от камерите за изпитване. Субстратите за хвърляне на хайвер трябва да се поставят в камерата за изпитване за *Pimephales promelas* и зебровото данио, за да се даде възможност на рибите да хвърлят хайвера си в нормални условия. В допълнение 4 се дават допълнителни подробности за препоръчителни субстрати за хвърляне на хайвер за зебровото данио (приложение 4А) и *Pimephales promelas* (приложение 4Б). Не се счита за необходимо да се предоставя субстрат за хвърляне на хайвер на оризията.

Умъртвяване на риби по хуманен начин

41. На ден 21, т.е. при приключване на експозицията, рибите следва да бъдат подложени на евтаназия с подходящи количества трикаин (трикаинов метансулфонат, метакан, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l буфериран с 300 mg/l NaHCO₃ (натриев хидрогенкарбонат, CAS 144-55-8), за да се намали дразненето на мукозните мембрани; след това се вземат проби от кръв или тъкани за определяне на VTG, както е обяснено в раздела за VTG.

Наблюдение на вторични полови белези

42. Някои химикали с активно действие върху ендокринната система могат да предизвикат промени в специализирани вторични полови белези (брой размножителни туберкули при мъжки *Pimephales promelas*, брой на папиларните израстъци при оризията от мъжки пол). Следва да се отбележи, че химикали с определени начини на действие могат да са причина за аномална проява на вторични полови белези при животни от противоположния пол; например агонисти на андрогенните рецептори като например тренболон, метилтестостерон и дихидротестостерон, могат да предизвикат поява на подчертано развити размножителни туберкули у женски *Pimephales promelas*, или развитие на папиларни израстъци при оризията от женски пол (11, 20, 21). Протоколирано е също, че агонисти на естрогенните рецептори могат да намалят броя на размножителните туберкули и размера на дорзалните отлагания на колаген при полово зрели мъжки индивиди от *Pimephales promelas* (26, 27). Такива макроскопски наблюдения на морфологията могат да предоставят полезна качествена и количествена информация за

▼ M7

потенциалните бъдещи изисквания за изпитвания на риби. Броят и размерът на размножителните туберкули при *Pimephales promelas* и папиларните израстъци при оризията могат да бъдат количествено определени директно или, по-практично, в консервирани екземпляри. Препоръчаните процедури за оценка на вторични полови белези при *Pimephales promelas* и при оризията са на разположение съответно в допълнение 5А и допълнение 5Б.

Вителогенин (VTG)

43. Пробовземането на кръв се извършва от опасната артерия/вена с хепаринизирана микрокапилярка за хематокрит или, като алтернативен вариант, чрез сърдечна пункция със спринцовка. В зависимост от размера на рибата обемът на кръвта за пробовземане обикновено варира между 5 и 60 μl на индивид за *Pimephales promelas* и 5-15 μl на индивид за зеброво данио. Плазмата се отделя от кръвта чрез центрофугиране и се съхранява с протеазни инхибитори при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до анализа за вителогенин. Като алтернатива, при оризията се използва черният дроб, а при зебровото данио като източник на тъкан за определяне на VTG може да се използва хомогенат глава/опашка (допълнение 6). Измерването на VTG следва да се основава на валидиран хомоложен ELISA метод, като се използва хомоложен VTG стандарт и хомоложни антитела. Препоръчва се използването на метод, който позволява да се открият нива VTG от порядъка на няколко ng/ml плазма (или ng/mg тъкан), което е фоновото ниво при неекспонирани мъжки риби.
44. Контролът на качеството на анализа на VTG се извършва чрез използването на еталони, празни проби и анализи с най-малко две повторения. За всеки ELISA метод следва да се проведе изпитване за матричен ефект (ефект на разреждане на пробата), за да се определи минималният коефициент на разреждане на пробата. Всяка ELISA плака, използвана за изследвания на VTG, следва да включва следните проби за контрол на качеството: най-малко 6 еталона за калибриране, покриващи диапазона от очаквани концентрации на VTG, и поне една празна проба за изследване за неспецифично свързване (анализ в две повторения). абсорбцията при тези празни проби следва да е по-малко от 5 % от максималната абсорбция на еталона за калибриране. Следва да се анализират най-малко две аликвотни части (две повторения в отделни гнезда) от всяко разреждане на проба. Повторенията в отделни гнезда, които се различават с повече от 20 %, следва да бъдат анализирани повторно.
45. Коефициентът на корелация (R^2) за калибрационните криви трябва да бъде по-голям от 0,99. Независимо от това, високата корелация не е достатъчна, за да гарантира адекватна прогноза за концентрацията във всички диапазони. В допълнение към достатъчно високата степен на корелация за калибрационната крива, концентрацията на всеки еталон, както е изчислена от калибрационната крива, следва да попада между 70 и 120 % от неговата номинална концентрация. В случай, че трендът на номиналните концентрации се отдалечава от тренда на регресионната линия (напр. при по-ниски концентрации), може да е необходимо калибрационната крива да се раздели на ниски и високи диапазони, или да се използва нелинеен модел за подходящо изглаждане на данните от абсорбцията. Ако кривата е раздвоена, и двата линейни участъка следва да са с $R^2 > 0,99$.
46. Границата на откриване (LOD) се определя като границата, под която концентрацията е твърде ниска за откриване на веществото, а границата на количествено определяне (LOQ) се определя като границата, под която концентрацията е твърде ниска за откриване на веществото, умножена по най-ниската кратност на разреждане.
47. Всеки ден, в който се извършват изследвания за VTG, се анализира проба с внесена добавка с използване на еталон, който е референтен между различни изследвания (допълнение 7). Отношението на очакваната концентрация към измерената концентрация се протоколира заедно с резултатите от всеки набор от изследвания от този ден.

Оценка на гонадната хистопатология

48. Извършването на гонадна хистопатология може да се изисква от регулаторните органи за проучване на прицелния орган по оста ХХГ след експозиция на химикали. В тази връзка гонадите се фиксират или *in situ*, или им се прави дисекция. Когато се изисква хистопатология, при

▼ **M7**

оценката на ендокринна активност на изпитвания химикал се търсят специфични ендокринно-свързани отклици при гонадите. Тези диагностични отклици по същество включват наличието на тестикулни ооцити, хиперплазия на Лайдиговите клетки, намалено образуване на жълтък, увеличени сперматогонии и перифоликуларна хиперплазия. Други увреждания на гонадите, като атрезия на ооцити, дегенерация на тестисите и изменения на стадии, могат да имат различни причини. В документа с насоки за хистопатологията на гонадите за риби се определят процедури, които ще бъдат използвани в дисекцията, фиксирането, разрязването и хистопатологичната оценка на гонадите (22).

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Оценка на откликите на биомаркерите чрез дисперсионен анализ (ANOVA)**

49. За идентифициране на потенциална активност на даден химикал се сравняват откликите между третираните и контролните групи с помощта на дисперсионен анализ (ANOVA). Когато се използва контрола на разтворител, за всяка крайна точка следва да се приложи подходящ статистически тест между контролите на вода за разреждане и на разтворител. Насоки за работата с данните за контролите на вода за разреждане и на разтворител при последващия статистически анализ могат да се намерят в източник OECD, 2006с (28). Всички биологични данни, свързани с отклици, следва да се анализират и протоколират отделно по пол. Ако изискваните допускания за използване на параметричен метод не са изпълнени — не е налице нормалност на разпределението (например тест на Шапиро-Уилк) или дисперсията е хетерогенна (тест на Бартлет или тест на Левин), преди извършването на ANOVA следва да се разгледа трансформиране на данните с оглед хомогенизиране на дисперсията, или извършване на ANOVA с претеглени средни. За немонотонна зависимост доза-отклик могат да се използват тестът на Дънет (параметричен) върху множествени сравнения по двойки, или тестът на Ман-Уитни с корекция на Бонферони (непараметричен). Ако зависимостта е приблизително монотонна, могат да се използват други статистически тестове (напр. тестът на Йонкхере-Терпстра или тестът на Уилямс). За подпомагане при вземането на решение относно използването на най-подходящия статистически тест в допълнение 8 е представена статистическа блокова схема. Допълнителна информация може да бъде получена също и от документа на ОИСП „Съвременни подходи за статистически анализ на данни за екоотоксичност“ (28).

Протоколиране на резултатите от изпитването

50. Данните от изследването следва да включват:

Извършваща изпитвания лаборатория:

- Отговорен персонал и неговите отговорности, свързани с изследването
- Всяка лаборатория трябва да е показала компетентността си чрез използване на набор от представителни химикали

Изпитван химикал:

- Характеризиране на изпитвания химикал
- Физична природа и относими физични и химични свойства
- Метод и честота на приготвяне на изпитваните концентрации
- Информация за стабилността и биоразградимостта

Разтворител:

- Характеристика на разтворителя (естество, използвана концентрация)
- Обосновка за избора на разтворителя (когато разтворителят е различен от вода)

▼ M7*Изпитвани животни:*

- Биологични видове и порода
- Доставчик и специални съоръжения на доставчика
- Възраст на рибите в началото на изпитването и репродуктивен статус/статус по отношение на хвърляне на хайвера
- Подробни данни за процедурата за аклиматизация на животните
- Телесно тегло на рибите в началото на експозицията (от подпроба от рибния запас)

Условия на изпитване:

- Използвана процедура на изпитване (тип изпитване, скорост на разреждане, гъстота на отглеждане и т.н.);
- Метод за приготвяне на изходни разтвори и скорост на потока;
- Номиналните концентрации на изпитване, измерваните седмично концентрации на разтворите за изпитването и използвания аналитичен метод, средни величини на измерените стойности и стандартни отклонения в съдовете за изпитване, и доказателство, че измерванията се отнасят за концентрациите на изпитвания химикал в истински разтвор;
- Характеристиките на водата за разреждане (включително рН, твърдост, алкалност, температура, концентрация на разтворен кислород, нива на остатъци от хлор, общо съдържание на органичен въглерод, суспендирани твърди частици и всякакви други направени измервания)
- Качество на водата в съдовете за изпитване: рН, твърдост, температура и концентрация на разтворен кислород;
- Подробна информация за храненето (например вид на храната(ите), източник, дадено количество и честота, и анализи за съдържание на относими замърсители, ако има такива (напр. полихлорирани бифенили, полициклични ароматни въглеводороди и органохлорни пестициди).

Резултати

- Доказателство, че контролите отговарят на критериите за приемане на изпитването;
- Данни за смъртността при всички нива на концентрацията на изпитване и в контролите;
- Използваните техники за статистически анализ, обработка на данните и обосновка за използваните техники;
- Данни за макроскопски биологични наблюдения на морфологията, включително вторични полови белези, получени хайверни зърна и VTG;
- Резултати от анализите на данните, за предпочитане в таблична и графична форма;
- Проява на необичайни реакции от страна на рибите и всякакви видими въздействия, причинени от изпитвания химикал

▼ **M7****НАСОКИ ЗА ИНТЕРПРЕТИРАНЕТО И ПРИЕМАНЕТО НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

51. Този раздел съдържа някои съображения, които трябва да се вземат предвид при тълкуването на резултатите от изпитването за различните измерени крайни точки. Резултатите трябва да се интерпретират внимателно, когато изглежда, че изпитваният химикал предизвиква ясно изразено токсично действие или оказва въздействие върху общото състояние на животното.
52. При задаването на обхвата на изпитваните концентрации трябва да се внимава да не се превишава максималната поносима концентрация, за да се даде възможност за съдържателно интерпретиране на данните. Важно е да има поне едно третиране, при което не са налице признаци на токсично въздействие. Признаците на заболяване и на токсично въздействие следва да бъдат подробно оценявани и протоколирани. Например, възможно е образуването на VTG в женски животни да е също така повлияно от обща токсичност и начини на токсично действие, различни от ендокринните, напр. хепатотоксичност. Независимо от това, тълкуването на въздействията може да бъде подкрепено чрез други нива на третиране, които да не водят до невъзможност за разграничаване поради системна токсичност.
53. Има няколко аспекта, които трябва да бъдат взети предвид при приемането на резултатите от изпитването. Като насока, нивата на VTG в контролните групи мъжки и женски животни следва да бъдат разграничени и разделени от около три порядъка при *Pimephales promelas* и зебровото данио, и от около един порядък при оризията. Примери за диапазона на стойностите, които се срещат в контролните групи и в групите на третиране, могат да бъдат намерени в протоколите за валидиране (1, 2, 3, 4). Високите стойности на VTG в контролни мъжки екземпляри могат да поставят под съмнение реагирането на биологичното изследване и способността му да открива слаби естрогенни агонисти. Ниските стойности на VTG в контролни женски екземпляри могат да поставят под съмнение реагирането на биологичното изследване и способността му да открива инхибитори на ароматазата и естрогенни антагонисти. Изследванията за валидиране са били използвани за изготвянето на тези насоки.
54. По отношение на количественото определяне на получаването на хайверни зърна, то показва значително вариране [коефициентът на вариация (CV) може да варира от 20 до 60 %], което накърнява способността на изследването за откриване на значимо намаляване на получаването на хайверни зърна, по-малко от 70 %, когато CV наближава 50 % или повече. Когато CV е ограничен до по-ниски стойности (около 20-30 %), тогава изпитването ще има приемлива мощност (80 %) за откриване на 40-50 % намаляване на получаването на хайверни зърна. Планът на изпитването, използван за *Pimephales promelas*, включващ четири повторения на ниво на третиране, следва да позволява по-голяма мощност за крайната точка плодовитост в сравнение с план на изпитването само с 2 повторения.
55. Ако дадена лаборатория не е извършвала изследването преди това, или са направени съществени промени (например промяна на породата на рибите или доставчика), е целесъобразно да се проведе проучване на техническата компетентност. Препоръчва се да се използват химикали, които обхващат широк спектър от механизми на действие или въздействия върху някои от крайните точки от изпитването. На практика всяка лаборатория се насърчава да изгради собствени контролни данни за предходни периоди за мъжките и женските индивиди, както и да извърши изпитване на химикал, представляващ положителна контрола за естрогенна активност (напр. 17 β -естрадиол при 100 ng/l, или известен слаб агонист), в резултат на което се увеличава VTG в мъжките риби, на химикал, представляващ положителна контрола за потискане на ароматазата (напр. фазрозол или прохлораз при 300 μ g/l), в резултат на което се намалява VTG в женския индивид, и на химикал, представляващ положителна контрола за андрогенна активност (напр. 17 β -треболон при 5 μ g/l), в резултат на което се индуцират вторични полови белези в женски *Pimephales promelas* и японска оризия. Всички тези данни могат да бъдат сравнявани с наличните данни от изследванията за валидиране (1, 2, 3), за да се гарантира компетентността на лабораторията.
56. Като цяло, измерванията на VTG следва да се считат за положителни, ако се наблюдава статистически значимо увеличаване на VTG при

▼ M7

мъжките индивиди ($p < 0,05$), или статистически значимо намаление при женските индивиди ($p < 0,05$) най-малко при най-високата доза на изпитване, в сравнение с контролната група, и при липса на признаци за обща токсичност. Положителният резултат се подкрепя допълнително от доказване на биологически реалистична връзка между дозата и кривата на отклика. Както беше споменато по-горе, намалението на VTG може да не е изцяло с ендокринен произход; независимо от това положителният резултат по принцип следва да се тълкува като доказателство за ендокринна активност *in vivo* и обичайно следва да води до предприемане на действия за допълнително изясняване.

57. Извършването на оценка на гонадна хистопатология може да се изисква от регулаторните органи за определяне на репродуктивното здраве на изпитваните животни и за даване на възможност за оценка на тежестта на доказателствата по отношение на резултатите от изпитването. Извършването на гонадна хистопатология може да не бъде необходимо в случаи, когато има положителен резултат или за VTG, или за вторичните полови белези (т.е. VTG се увеличава или намалява, или се индуцират вторични полови белези).

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, Paris.
- (1) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, Paris.
- (2) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, Paris.
- (3) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (accessed 18/09/08).
- (4) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.
- (5) OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, Paris.
- (6) Sumpter J.P. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*; 103 Suppl 7:173-8 Review.
- (7) Pawlowski S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68(3):277-91.
- (8) Andersen L., *et al.* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343-52.
- (9) Ankley G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*; 67(1):121-30.
- (10) Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.

▼ M7

- (11) Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.
- (12) Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.
- (13) Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (14) Holbech H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131
- (15) Rose J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 131: 531-539.
- (16) Brion F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- (17) Yokota H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87-98.
- (18) Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.
- (19) Ankley G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17 β -trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6): 1350-60.
- (20) Seki M, *et al* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3):774-81.
- (21) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Paris.
- (22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris
- (23) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.69-92.
- (24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts,“ not „traffic lights,“ in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*; 114 Suppl 1:106-14.
- (25) Miles-Richardson S.R., *et al.* (1999). Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.

▼ M7

- (26) Martinovic D., *et al.* (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
- (27) OECD (2006c), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.
- (28) US EPA (2008), *Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay*, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.
- (29) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disruptors*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Paris.

▼ M7

Допълнение 1

СЪКРАЩЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Химикал: вещество или смес.

CV: коефициент на вариация

ELISA: Ензимно-свързан имуносорбентен анализ

XXГ ос: хипоталамус-хипофиза-гонадна ос

Скорост на зареждане: мокрото тегло на рибите на обем вода.

МПК: максимално поносима концентрация, която представлява около 10 % от LC₅₀.

Гъстота на отглеждане: брой на рибите на обем вода.

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

VTG: вителогенинът е фосфолипогликопротеин, който е прекурсор на белтъците в яйчния жълтък и обикновено се среща в полово активните женски индивиди от всички яйценосни видове.

▼M7

Допълнение 2

ОПИТНИ УСЛОВИЯ ЗА СКРИНИНГОВОТО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕНДОКРИННАТА СИСТЕМА ПРИ РИБИ

1. Препоръчани видове	Pimephales promelas	Японска оризия (<i>Oryzias latipes</i>)	Зеброво данио (<i>Danio rerio</i>)
2. Тип на изпитването	Проточно	Проточно	Проточно
3. Температура на водата	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Качеството на осветлението	Луминесцентни крушки (широк спектър)	Луминесцентни крушки (широк спектър)	Луминесцентни крушки (широк спектър)
5. Светлинен интензитет	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, или 50-100 ft-c (заобикалящи равнища на осветеност в лабораторията)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, или 50-100 ft-c (заобикалящи равнища на осветеност в лабораторията)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, или 50-100 ft-c (заобикалящи равнища на осветеност в лабораторията)
6. Продължителност на излагане на светлина (преходните фази на разсъване и здрач са по избор, но не се считат за необходими)	16 h светлина, 8 h тъмнина	12-16 h светлина, 12-8 h тъмнина	12-16 h светлина, 12-8 h тъмнина
7. Скорост на зареждане	< 5 g на l	< 5 g на l	< 5 g на l
8. Размер на камерата за изпитване	10 l (най-малко)	2 l (най-малко)	5 l (най-малко)
9. Обем на изпитвания разтвор	8 l (най-малко)	1,5 l (най-малко)	4 l (най-малко)
10. Обменени обеми на изпитвани разтвори	Най-малко 6 дневно	Най-малко 5 дневно	Най-малко 5 дневно
11. Възраст на изпитваните организми	Вж. точка 21	Вж. точка 21	Вж. точка 21
12. Приблизително мокро тегло на половозряла риба (g)	Женски: 1,5 ± 20 % Мъжки: 2,5 ± 20 %	Женски: 0,35 ± 20 % Мъжки: 0,35 ± 20 %	Женски: 0,65 ± 20 % Мъжки: 0,4 ± 20 %
13. Брой на рибите на съд за изпитване	6 (2 мъжки и 4 женски)	6 (3 мъжки и 3 женски)	10 (5 мъжки и 5 женски)
14. Брой третираня	= 3 (плюс подходящи контроли)	= 3 (плюс подходящи контроли)	= 3 (плюс подходящи контроли)
15. Брой съдове на третиране	най-малко 4	най-малко 4	най-малко 2
16. Брой на рибите на концентрация на изпитване	16 половозрели женски и 8 мъжки (4 женски и 2 мъжки във всеки един съд с повторение)	12 половозрели женски и 12 мъжки (3 женски и 3 мъжки във всеки един съд с повторение)	10 половозрели женски и 10 мъжки (5 женски и 5 мъжки във всеки един съд с повторение)
17. Режим на хранене	Живи или замразени половозрели артемии или науплии от артемии два или три пъти дневно (<i>ad libitum</i>), налични в търговската мрежа храни или комбинация от горепосочените	Науплии от артемии два или три пъти дневно (<i>ad libitum</i>), налични в търговската мрежа храни или комбинация от горепосочените	Науплии от артемии два или три пъти дневно (<i>ad libitum</i>), налични в търговската мрежа храни или комбинация от горепосочените

▼ M7

18. Аериране	Няма, освен в случаите, когато концентрацията на разтворения кислород падне под 60 % от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух	Няма, освен в случаите, когато концентрацията на разтворения кислород падне под 60 % от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух	Няма, освен в случаите, когато концентрацията на разтворения кислород падне под 60 % от стойността на насищане при равновесие с атмосферния въздух
19. Вода за разреждане	Вода с чиста повърхност, кладенчова или възстановена вода или дехлорирана чешмяна вода	Вода с чиста повърхност, кладенчова или възстановена вода или дехлорирана чешмяна вода	Вода с чиста повърхност, кладенчова или възстановена вода или дехлорирана чешмяна вода
20. Период преди експозицията	препоръчват се 7-14 дни	препоръчват се 7-14 дни	препоръчват се 7-14 дни
21. Продължителност на експозицията на химикала	21-d	21-d	21-d
22. Биологични крайни точки	— преживяване — поведение — плодовитост — 2-чни полови белези — VTG — като вариант гонадна хистопатология	— преживяване — поведение — плодовитост — 2-чни полови белези — VTG — като вариант гонадна хистопатология	— преживяване — поведение — плодовитост — VTG — като вариант гонадна хистопатология
23. Приемливост на изпитването	Разтворен кислород $\geq 60\%$ от стойността на насищане; средна температура 25 ± 2 °C; 90 % преживели риби в контролите; измерени концентрации на изпитване в рамките на 20 % от средните измерени стойности на ниво на третиране.	Разтворен кислород $\geq 60\%$ от стойността на насищане; средна температура 25 ± 2 °C; 90 % преживели риби в контролите; измерени концентрации на изпитване в рамките на 20 % от средните измерени стойности на ниво на третиране.	Разтворен кислород $\geq 60\%$ от стойността на насищане; средна температура 26 ± 2 °C; 90 % преживели риби в контролите; измерени концентрации на изпитване в рамките на 20 % от средните измерени стойности на ниво на третиране.

▼ M7*Допълнение 3***НЯКОИ ХИМИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПРИЕМЛИВА ВОДА
ЗА РАЗРЕЖДАНЕ**

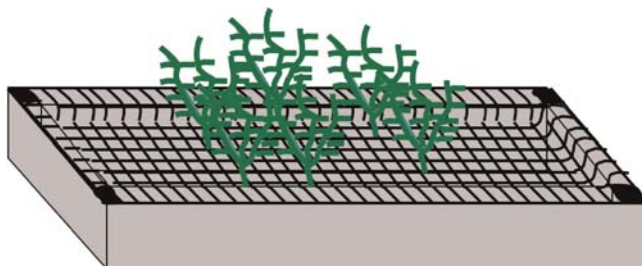
КОМПОНЕНТ	КОНЦЕНТРАЦИИ
Твърди частици	< 20 mg/l
Общ органичен въглерод	< 2 mg/l
Нейонизиран амоняк	< 1 µg/l
Остагъчен хлор	< 10 µg/l
Общо органофосфорни пестициди	< 50 ng/l
Общо органохлорни пестициди плюс полихлорирани бифенили	< 50 ng/l
Общ органичен хлор	< 25 ng/l

▼ M7

Допълнение 4А

СУБСТРАТ ЗА ХВЪРЛЯНЕ НА ХАЙВЕР ЗА ЗЕБРОВО ДАНИО

Вана за хвърляне на хайвера: всякакви стъклени съдове за инструменти с примерни дължина 22 cm × ширина 15 cm × дълбочина 5,5 cm, покрити с отстранима телена решетка от неръждаема стомана (с ширина на отворите 2 mm). Решетката следва да покрива отвора на съда за инструменти на равнище, по-ниско от ръба на съда.



Върху решетката следва да бъде фиксиран субстрат за хвърляне на хайвер. Той следва да представлява структура, в която рибите да могат да се движат. Например, подходяща е изкуствена аквариумна растителност, изработена от зелен пластмасов материал (NB: следва да се обърне внимание на възможна адсорбция на изпитвания химикал върху пластмасовия материал). Пластмасата следва да бъде промита в достатъчно количество топла вода за период, достатъчен, за да се гарантира, че няма да преминат химикали във водата за изпитването. Когато се използват стъклени материали, следва да се гарантира, че при извършване на енергични движения рибите не се увреждат и не си пречат.

Разстоянието между ваната и стъклените стени трябва да бъде най-малко 3 cm, за да се гарантира, че хвърлянето на хайвер не се извършва извън ваната. Хвърленият във ваната хайвер пропада през решетката и може да бъде пробовзет 45-60 min след началото на периода на осветление. Прозачните хайверни зърна не се слепват и могат лесно да бъдат преброени, като се използва напречно осветление. Когато се използват пет женски животни на съд, брой на хайверните зърна до 20 на ден може да се счита за нисък, до 100 за среден и над 100 за висок. Ваната за хвърляне на хайвер следва да се отстрани, хайверните зърна се събират и ваната се поставя отново в съда за изпитване или възможно най-късно вечерта, или много рано сутринта. Времето до повторното поставяне не следва да надвишава един час, защото в противен случай е възможно сигналът от субстрата за хвърляне на хайвер да предизвика чифтосване и хвърляне на хайвер по необичайно време. Ако в дадена ситуация се изисква по-късно въвеждане на ваната за хвърляне на хайвер, това следва да бъде направено поне 9 часа след началото на периода на осветление. През тази късна част от деня вече не се предизвиква хвърляне на хайвер.

▼ M7

Допълнение 4Б

СУБСТРАТ ЗА ХВЪРЛЯНЕ НА ХАЙВЕР ЗА PIMEPHALES PROMELAS

Две или три комбинирани пластмасови/керамични/от неръждаема стомана къщички с форма на керемидата и вани за хвърляне на хайвер се поставят във всяка камера за изпитване (напр. сив полукръгъл улук с дължина 80 mm, поставен върху ваната с дължина 130 mm, с опорен издатък) (вж. изображението). За аклиматизирани по подходящ начин керемиди от поливинилхлорид или керамичен материал е доказано, че са подходящи като субстрат за хвърляне на хайвер (Thorpe *et al*, 2007).

Препоръчително е керемидите да са шлайфани за подобряване на прилепването. Ваната също така следва да бъде преградена, за да се предотврати достъпът на рибите до падналите хайверни зърна, освен ако ефикасността на прилепването на хайверните зърна не е доказана за използвания субстрат за хвърляне на хайвер.



Основата е проектирана да побира всички хайверни зърна, които не са прилепнали към повърхността на керемидата, и следователно биха паднали на дъното на контейнера (или хайверни зърна, положени направо върху плоската пластмасова основа). Преди употреба всички субстрати за хвърляне на хайвер трябва да се промият в продължение на минимум 12 часа във вода за разреждане.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

▼ M7

Допълнение 5А

ОЦЕНКА НА ВТОРИЧНИ ПОЛОВИ БЕЛЕЗИ У PIMEPHALES PROMELAS ЗА ОТКРИВАНЕ НА ОПРЕДЕЛЕНИ ХИМИКАЛИ С АКТИВНО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ ЕНДОКРИННАТА СИСТЕМА

Преглед

При изпитвания за нарушители на функциите на ендокринната система потенциално важните характеристики на външния вид на полово зрели *Pimerphales promelas* включват цвят на тялото (т.е. светло/тъмно оцветяване), начини на оцветяване (т.е. наличието или отсъствието на вертикални ленти), форма на тялото (т.е., форма на главата и гръдната област, разширяване на коремната кухина), както и специализирани вторични полови белези (т.е., брой и размер на размножителните туберкули, размери на дорзалните отлагания на колаген и яйцеполагалото).

Размножителните туберкули са разположени върху главата (дорзалните отлагания) на репродуктивно активните мъжки *Pimerphales promelas* и обикновено са подредени двустранно симетрично (Jensen *et al.* 2001). При контролните женски и ювенилните животни от мъжки и женски пол не се наблюдава развитие на туберкули (Jensen *et al.* 2001). Възможни са до осем отделни туберкули около очите и между ноздрите на мъжките екземпляри. Най-голям брой и най-големи туберкули са разположени в два успоредни реда, непосредствено под ноздрите и над устата. При много риби съществуват групи от туберкули под долната челюст; тези, които са най-близо до устата, обикновено са един чифт, докато разположените вентрално от тях могат да се състоят от до четири туберкули. Действителният брой на туберкулите рядко е повече от 30 (обхват от 18—28; Jensen *et al.* 2001). Преобладаващите туберкули (по отношение на броя) представляват единични, относително заоблени структури, с височина приблизително равна на радиуса. Повечето репродуктивно активни мъжки животни също имат поне няколко туберкули, които са разширени и подчертано развити по такъв начин, че не могат да бъдат разграничени като отделни структури.

Някои типове химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система, могат да причинят необичайната поява на някои вторични полови белези в другия пол; например агонисти на андрогенните рецептори като например 17 α -метилтестостерон или 17 β -тренболон, могат да предизвикат поява на подчертано развити размножителни туберкули у женски *Pimerphales promelas* (Smith, 1974 г.; Ankley *et al.* 2001; 2003), докато агонисти на естрогенните рецептори могат да предизвикат намаляване на размножителните туберкули у мъжки индивиди (Miles-Richardson *et al.* 1999; Harries *et al.* 2000).

По-долу е представено описание на характеризирането на размножителни туберкули у *Pimerphales promelas* въз основа на процедурите, използвани в лабораторията на Американската агенция за защита на околната среда в Duluth, MN. Специфичните продукти и/или оборудване могат да бъдат заменени с налични сравними материали.

Наблюдението се извършва най-добре с помощта на увеличително стъкло с осветително тяло или със стереомикроскоп с осветително тяло и увеличение 3X. Рибата се наблюдава дорзално с предната част в посока напред (глава към наблюдателя).

— Рибата се поставя в малко блюдо на Петри (напр. 100 mm в диаметър), с предната част в посока напред, с коремния дял надолу. Визьорът се фокусира, за да се даде възможност за идентифициране на туберкулите. Рибата се обръща леко и бавно от една страна на друга, за да се идентифицират областите с туберкули. Туберкулите се преброяват и ранжират.

— Наблюдението се повтаря по отношение на предната част на коремния дял, чрез поставяне на рибата дорзално с предната част в посока напред в блюдото на Петри.

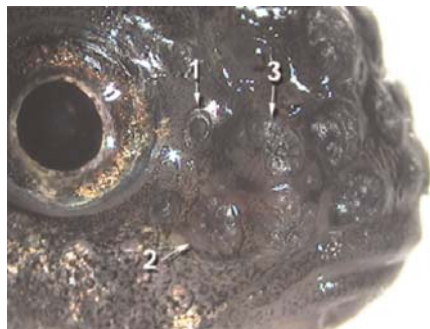
— Наблюденията трябва да бъдат извършени в рамките на 2 минути за всяка риба.

▼ **M7****Броене и ранжиране на туберкулите**

Определени са шест конкретни области за оценка на наличието и развитието на туберкули в половно зрели *Pimerphales promelas*. Разработен е образец за отбелязване на местоположението и количеството на налични туберкули (вж. в края на настоящото допълнение). Броят на туберкулите се записва и техните размери могат да бъдат количествено ранжирани като: 0- липсва, 1-наличен, 2-уголемен и 3-подчертано развит за всеки организъм (фиг. 1).

Ранг 0 — липса на туберкули. Ранг 1 — наличен, присвоява се на всеки туберкул, който има точка, чиято височина е почти равна на радиуса му. Ранг 2 — уголемен, присвоява се при тъкан с външен вид, наподобяващ звездичка, обикновено с голяма радиална база с вдлъбнатини или бразди, излизащи от центъра. Височината на туберкула често е по-неравна, но понякога може до известна степен да е закръглена. Ранг 3 — подчертано развит, обикновено е доста голям и закръглен, с по-неопределена структура. Понякога тези туберкули са разположени заедно, образувайки обща маса по протежение на отделна област или съчетание от области (B, C и D, описани по-долу). Оцветяването и формата са сходни с ранг 2, но понякога са твърде произволни. Използването на тази рангова система най-общо води като цяло до резултати от ранжирането < 50 в нормален контролен мъжки индивид, притежаващ 18 до 20 броя туберкули (Jensen *et al.* 2001).

Фигура 1



Действителният брой на туберкулите при някои риби може да е по-голям от полетата в образеца за определена област на ранжиране. В такъв случай вътре могат да бъдат отбелязани допълнителни числа, вдясно или вляво от полето. Следователно не е необходимо образецът да показва симетрия. Допълнителен метод за отбелязване на местоположението на туберкули, които са чифтни или съединени вертикално по протежение на хоризонталната равнина на устата, може да се осъществи чрез двойно отбелязване на два ранга на туберкули в едно поле.

Области за отбелязване на местоположението:

A — туберкули, разположени около окото. Положението се отбелязва дорзално към вентрално около предния край на окото. Обичайно са много при половно зрели мъжки от контроли, не са налични при женски, като цяло чифтни (един в близост до всяко око) или единични при женски животни, експонирани на андрогени.

B-туберкули, разположени между ноздрите (сензорни канали). Обикновено чифтни при мъжките в контролите с по-висок ранг за развитие (2- уголемен или 3- подчертано развит). Не са налични при женски от контролите, с известно срещане и развитие при женски животни, експонирани на андрогени.

C — туберкули, разположени непосредствено задно от ноздрите, успоредно на устата. Обикновено уголемени или подчертано развити при половно зрели мъжки от контроли. Налични или уголемени при по-слабо развитите мъжки или при женски животни, експонирани на андрогени.

▼ **M7**

D — туберкули, разположени успоредно по линията на устата. Като цяло се ранжират като развити в контролните животни от мъжки пол. Липсващи в контролните животни от женски пол, но налични при женски животни, експонирани на андрогени.

E — туберкули, разположени по долната челюст, близо до устата, обикновено малки и обичайно чифтни. Варират при контролните или третираните мъжки, и третираните женски индивиди.

F — туберкули, разположени вентрално от E. Обикновено малки и чифтни. Налични в контролните животни от мъжки пол и при женски животни, експонирани на андрогени.

Позовавания

- (1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.
- (2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- (3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.
- (4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.
- (5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.
- (6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47:129-145.
- (7) Smith RJF. 1974. Effects of 17 α -methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52:1031-1038.

Образец за туберкули

ID _____

Дата _____

Общ резултат _____

Ранжиране с числови стойности на ранга

1-наличен

2-уголемен

3-подчертано развит

	A	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	B	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	C	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
	D	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1

	E	X1	X1	
	F	X1	X1	X1

▼ M7

Допълнение 5Б

ОЦЕНКА НА ВТОРИЧНИ ПОЛОВИ БЕЛЕЗИ У ЯПОНСКАТА ОРИЗИЯ ЗА ОТКРИВАНЕ НА ОПРЕДЕЛЕНИ ХИМИКАЛИ С АКТИВНО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ ЕНДОКРИННАТА СИСТЕМА

По-долу е представено описание на измерването на папиларните израстъци⁽¹⁾, които са вторични полови белези при японската оризия (*Oryzias latipes*).

- (1) След изрязване на черния дроб (допълнение 6), трупът се поставя в конична епруветка, съдържаща около 10 ml 10 % неутрален буфериран формалин (горна страна: глава, долна страна: опашка). Ако гонадата е фиксирана в разтвор, различен от 10 % неутрален буфериран формалин, прави се напречен разрез през трупа между предната област на аналната перка и ануса, с използване на бръснач, като се внимава да не се увреди половият отвор и самата гонада (фиг. 3). Краниалната част от тялото на рибата се поставя в разтвора на фиксатора за запазване на гонадата, а опашната част от тялото на рибата се поставя в 10 % неутрален буфериран формалин, както е описано по-горе.
- (2) След поставянето на тялото на рибата в 10 % неутрален буфериран формалин задният край на аналната перка се захваща с пинцети и се разтваря за около 30 секунди, за да се запази аналната перка отворена. При захващането на аналната перка с пинцети се захващат няколко лъча на перката в предната област, като се внимава да не се надраскат папиларните израстъци.
- (3) След държането на аналната перка отворена в продължение на около 30 секунди, тялото на рибата се съхранява в 10 % неутрален буфериран формалин при стайна температура до измерването на папиларните израстъци (измерването следва да се проведе след фиксиране в продължение най-малко на 24 часа).

Измерване

- (1) След фиксиране на тялото на рибата в 10 % неутрален буфериран формалин в продължение най-малко на 24 часа, трупът на рибата се взема от коничната епруветка и формалинът се избърсва върху филтърна хартия (или хартиена кърпа).
- (2) Рибата се поставя с корема нагоре. След това аналната перка се изрязва внимателно с малки ножици за дисекция (за предпочитане е да се изреже аналната перка с малко количество птеригофор).
- (3) С пинцети се захваща предната област от отрязаната анална перка и тя се поставя върху предметно стъкло с няколко капки вода. След това аналната перка се покрива с покривно стъкло. При захващането на аналната перка с пинцети се внимава да не се надраскат папиларните израстъци.
- (4) Отчита се броят членчета с папиларни израстъци, като се използва брояч под биологичен микроскоп (изправен или инвертен микроскоп). Папиларните израстъци се познават, когато в задната част на членчетата се вижда малко образуване от израстъци. В работната таблица се записва броят на членчетата с папиларни израстъци във всеки лъч на перка (напр. първи лъч на перка: 0, втори лъч на перка: 10, трети лъч на

⁽¹⁾ Папиларните израстъци обикновено се появяват само при полово зрели мъжки и се намират на лъчите на перките, като се започне от втория, до седмия или осмия от задния край на аналната перка (фиг. 1 и 2). Независимо от това, израстъци рядко се появяват на първия лъч от задния край на аналната перка. Тази стандартна оперативна процедура (СОП) обхваща измерването на израстъците на първия лъч на перка (в настоящата СОП номерът на лъча на перка се отнася за поредния номер, считано от първия лъч в задния край на аналната перка).

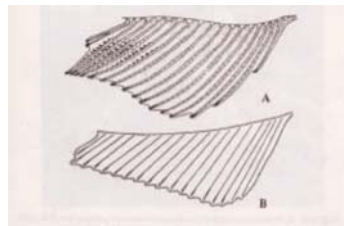
▼ M7

перка: 12 и т.н.) и се вписва сумата им в таблицата в Excel за всеки отделен екземпляр. Ако е необходимо, аналната перка се фотографира и върху снимката се отчита броят на членчетата с папиларни израстъци.

- (5) След измерването аналната перка се поставя в коничната епруветка, описана в 1) и се съхранява.

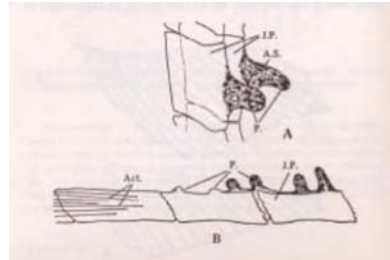
Фиг. 1.

Схема, показваща разликата при половете по отношение на формата и размера на аналната перка. А, мъжка; В, женска. Ока, Т. В., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



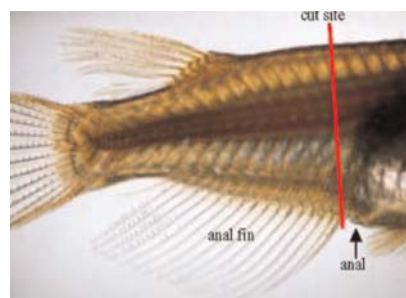
Фиг. 2.

А, папиларни израстъци върху членчета от лъч на анална перка. J.P., членче; A.S., аксиално пространство; P., израстък. В, дистален край на лъч на перка. Дистално в края на лъча са разположени колагенни фибри (Actinotrichia) (Act.). Ока, Т. В., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



Фиг. 3.

Снимка на тяло на риба, показваща мястото на срязване, когато гонадата се фиксира в разтвор на фиксатор, различен от 10 % неутрален буфериран формалин. В този случай останалата част от тялото се разрязва между предната област на аналната перка и ануса с помощта на бръснач (червена лента), и предната част от тялото на рибата се поставя в разтвора на фиксатор за гонади, а опашната част от тялото на рибата се поставя в 10 % неутрален буфериран формалин.



▼ M7

Допълнение 6

ПРЕПОРЪЧИТЕЛНИ ПРОЦЕДУРИ ЗА СЪБИРАНЕТО НА ПРОБИ ЗА АНАЛИЗ НА ВИТЕЛОГЕНИН

Трябва да се вземат мерки за избягване на кръстосано замърсяване между пробите с VTG от мъжки и от женски животни.

Процедура 1A: Вземане на кръвна проба от опасна вена/артерия от *Pimephales promelas*

След подлагане на анестезия, опасното стъбло частично се отрязва със скалпел и се взема кръв от опасната вена/артерия с хепаринизирана микрокапиларка за хематокрит. След вземането на кръвната проба плазмата бързо се отделя чрез центрофугиране при 15 000 g за 3 минути (или алтернативно при 15 000 g за 10 минути при 4 °C). По избор, процентът хематокрит може да се определи след центрофугирането. Частта плазма се отстранява от микрокапиларката за хематокрит и се съхранява в центрофужна епруветка с 0,13 единици аprotинин (протеазен инхибитор) при – 80 °C, докато може да бъде извършено определяне на VTG. В зависимост от размера на *Pimephales promelas* (който зависи от пола) събираемият обем плазма обикновено е в интервала от 5 до 60 микролитра на риба (Jensen *et al.* 2001).

Процедура 1B: Вземане на кръвна проба от сърце от *Pimephales promelas*

Като алтернатива, кръвна проба може също така да се вземе чрез сърдечна пункция с помощта на хепаризирана спринцовка (1 000 единици хепарин/ml). Кръвта се прехвърля в епендорфови епруветки (държани върху лед) и се центрофугира (5 минути, 7 000 g, стайна температура). Плазмата следва да се прехвърли в чисти епендорфови епруветки (в аликвотни части, ако обемът на плазмата позволява това) и бързо да се замрази при температура – 80 °C до нейното анализиране (Panter *et al.*, 1998).

Процедура 2A: Изрязване на черен дроб от японска оризия

Отстраняване на изпитваната риба от камерата за изпитване

- (1) Изпитваната риба следва да се отстрани от изпитвателната камера с помощта на малко кепче. Следва да се внимава изпитваната риба да не попадне в други камери за изпитване.
- (2) По принцип изпитваните риби следва да бъдат отстранявани в следния ред: контрола, контрола на разтворител (където е приложимо), най-ниска концентрация, средна концентрация, най-висока концентрация и положителна контрола. В допълнение, всички мъжки животни следва да бъдат отстранени от дадена камера за изпитване преди да бъдат отстранени оставащите женски.
- (3) Полът на всяка изпитвана риба се определя въз основа на външни вторични полови белези (напр. формата на аналната перка).
- (4) Изпитваната риба се поставя в контейнер за пренасяне и се пренася до работното място за изрязване на черния дроб. За точност и за потвърждаване, че броят на рибите, които са отстранени от камерата за изпитване, и броят на рибите, останали в камерата за изпитване, са в съответствие с очакванията, се проверяват етикетите на камерата за изпитване и на контейнера за пренасяне.
- (5) Ако полът не може да бъде определен по външния вид на рибата, от камерата за изпитване се отстраняват всички риби. В този случай полът следва да бъде определен чрез наблюдение на гонадата или на вторични полови белези под стереомикроскоп.

Изрязване на черния дроб

- (1) Изпитваните риби се прехвърлят от контейнера за пренасяне в разтвор за подлагане на анестезия с помощта на малкото кепче.

▼ M7

- (2) След анестезирането изпитваните риби се прехвърлят върху филтърната хартия (или хартиена кърпа) с пинсети (разпространени в търговската мрежа). При захващането на изпитваните риби пинцетите се прилагат от страни на главата, за да се предотврати счупването на опашката.
- (3) Водата се избърсва от повърхността на изпитваните риби върху филтърната хартия (или хартиената кърпа).
- (4) Рибата се поставя с корема нагоре. След това се прави малък напречен разрез между областта на врата вентрално и областта в средата на корема с помощта на ножици за дисекция.
- (5) Ножиците за дисекция се вкарват в малката инцизия и се разрязва коремът от определена точка каудално от бронхиалната мантия до краниално от ануса по средната линия на корема. Внимава се ножиците за дисекция да не се вкарват прекомерно дълбоко, за да се избегне увреждане на черния дроб и гонадата.
- (6) Под стереомикроскоп се извършват следните операции.
- (7) Изпитваната риба се поставя с корема нагоре върху хартиената кърпа (стъклено блюдо на Петри или предметно стъкло също така са на разположение).
- (8) Стените на коремната кухина се разширяват с прецизни пинсети и вътрешните органи се екстериоризират. Също така, приемливо е екстериоризирането на вътрешните органи да се извърши чрез отстраняване на едната страна от стената на коремната кухина, ако е необходимо.
- (9) С помощта на друг чифт прецизни пинцети се разкрива свързаната част на черния дроб и жлъчния мехур. След това се захваща жлъчният канал и се прекъсва жлъчният мехур. Внимава се да не се пробие жлъчният мехур.
- (10) Захваща се хранопроводът и по същия начин стомашно-чревният тракт се изрязва от черния дроб. Внимава се да не се допусне изтичане на съдържанието на стомашно-чревния тракт. Стомашно-чревният тракт се изрязва каудално от ануса и се отстранява от коремната кухина.
- (11) Отстранява се масата от мазнини и други тъкани от периферията на черния дроб. Внимава се да не се надраска черният дроб.
- (12) С помощта на прецизните пинцети се захваща областта на вратата на черния дроб и черният дроб се отстранява от коремната кухина.
- (13) Черният дроб се поставя върху предметното стъкло. С помощта на прецизните пинцети от повърхността на черния дроб се отстраняват всякакви допълнителни мазнини и чужди тъкани (напр. перитонеумът), ако е необходимо.
- (14) Теглото на черния дроб се измерва като тара с 1,5 ml микропруветка, с помощта на електронна аналитична везна. Стойността се вписва в работния лист (точност: 0,1 mg). Потвърждава се информацията за идентифициране, намираща се върху етикета на микропруветката.
- (15) Капачката на микропруветката, съдържаща черния дроб, се затваря. Тя се съхранява в охладителен статив (или охладителен статив с лед).
- (16) След изрязването на всеки черен дроб инструментите за дисекцията се почистват или се заменят с чисти.

▼ M7

- (17) Отстранява се черният дроб от всички риби, намиращи се в контейнера за пренасяне, както е описано по-горе.
- (18) След като черният дроб е изрязан от всички риби в контейнера за пренасяне (т.е. от всички мъжки или женски в дадена камера за изпитване) всички екземпляри от черен дроб се поставят на статив за епруветки с етикет за идентификация и се слагат за съхранение във фризер. Когато черният дроб се дава за предварителна обработка непосредствено след изрязването, екземплярите се пренасят до следващото работно място в охладителен статив (или охладителен статив с лед).

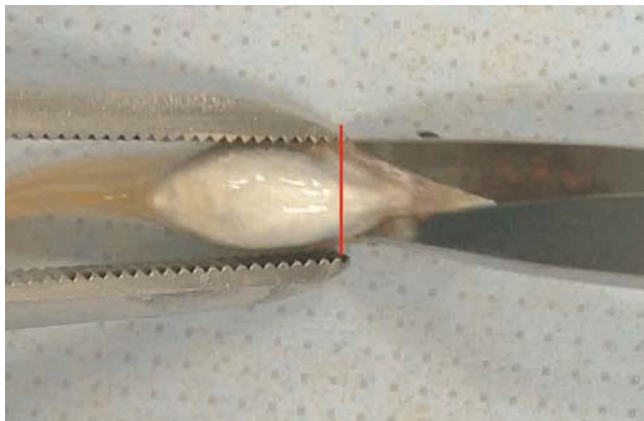
След изрязването на черния дроб трупът на рибата е на разположение за гонадна хистология и за измерване на вторични полови белези.

Екземпляри

Ако не се използват за предварителна обработка непосредствено след изрязването, екземплярите от черен дроб, взети от изпитваните риби, се съхраняват при ≤ -70 °C.

Фиг-1

Прави се разрез с ножици точно пред гръдните перки.

*Фиг-2*

Средната линия на корема се разрязва с ножица до точка, разположена приблизително 2 mm краниално от ануса.



▼ M7

Фиг-3

Коремните стени се разтварят с пинцети за разкриване на черния дроб и други вътрешни органи

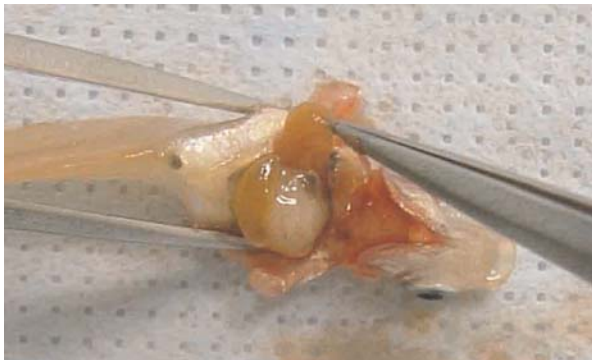
(като алтернатива, коремните стени могат да се забодат латерално).

Стрелката показва черния дроб.



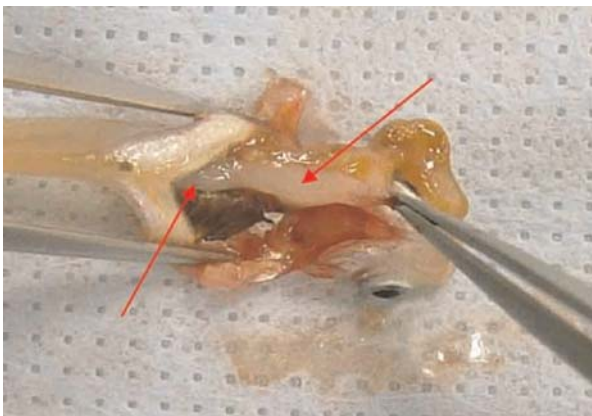
Фиг-4

С помощта на пинцети се прави дисекция на черния дроб и същият се изрязва.



Фиг-5

Червата леко се издърпват с помощта на пинцети.



▼ M7

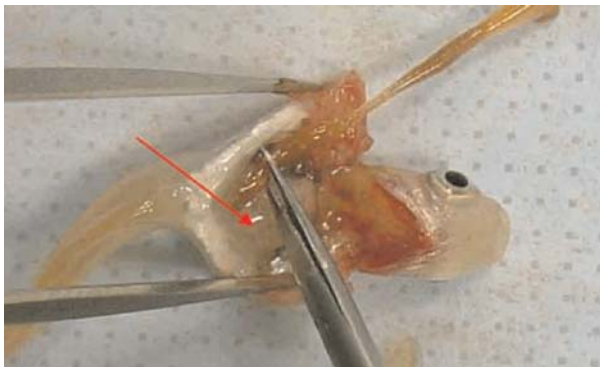
Фиг-6

Двата края на червата и мезентериалните връзки се отрязват с ножици.



Фиг-7 (женски)

Процедурата е идентична като тази при мъжките.



Фиг-8

Завършената процедура.



▼ **M7****Процедура 2 В: Японска оризия (*Oryzias latipes*), предварителна обработка на черен дроб за анализ на вителогенин**

Взема се бутилката с буфера за хомогенат от комплекта за ELISA и се охлажда с натрошен лед (температура на разтвора: ≤ 4 °C). Ако се използва буфер за хомогенат от EnBio ELISA система, разтворът се размразява при стайна температура и след това бутилката се охлажда с натрошен лед.

Изчислява се обемът на буфера за хомогенат за черния дроб въз основа на теглото му (добавят се 50 μ l буфер за хомогенат на mg тегло на черен дроб). Например, ако теглото на черния дроб е 4,5 mg, обемът на буфера за хомогенат за черния дроб е 225 μ l. Изготвя се списък с обемите на буфера за хомогенат за всички екземпляри черен дроб.

Подготовка на черния дроб за предварителната обработка

- (1) Непосредствено преди предварителната обработка микропруветката от 1,5 ml, съдържаща черния дроб, се взема от фризера.
- (2) Предварителна обработка на черния дроб от животни от мъжки пол следва да се извършва преди тази при женските животни, за да се предотврати замърсяване с вителогенин. Освен това, предварителната обработка за изпитваните риби следва да се извършва в следния ред: контрола, контрола на разтворител (където е приложимо), най-ниска концентрация, средна концентрация, най-висока концентрация и положителна контрола.
- (3) Броят на взетите от фризера в даден момент микропруветки от 1,5 ml, съдържащи проби черен дроб, не следва да надвишава броя, който може да се центрофугира по това време.
- (4) Микропруветките от 1,5 ml, съдържащи проби черен дроб, се подреждат на охладителния статив с лед по реда на екземпляра (няма нужда от размразяване на черния дроб).

Извършване на предварителната обработка

- 1) Добавяне на буфера за хомогенат

Проверява се списъкът за обема на буфера за хомогенат, който да се използва за определена проба черен дроб и микропипетата се настройва (диапазон на обемите: 100-1 000 μ l) към подходящия обем. Постава се чист връх на микропипетата.

Буферът за хомогенат се взема от бутилката с реактива и се добавя в микропруветката от 1,5 ml, съдържаща проба черен дроб.

Буферът за хомогенат се добавя във всички микропруветки от 1,5 ml, съдържащи проба черен дроб, в съответствие с гореописаната процедура. Не е необходимо да се сменя върхът на микропипетата с нов. Независимо от това, ако върхът е замърсен или се предполага, че е замърсен, той следва да бъде сменен.

- 2) Хомогенизиране на черния дроб

— Постава се нов пестик за хомогенизиране в хомогенизатора за микропруветката.

— Пестикът се поставя в микропруветката от 1,5 ml. Хомогенизаторът се държи за натиск върху черния дроб между повърхността на пестика и вътрешната стена на микропруветката от 1,5 ml.

— Хомогенизаторът за микропруветката се оставя да функционира в продължение на 10 до 20 секунди. Микропруветката от 1,5 ml се охлажда с натрошен лед по време на функционирането.

▼ M7

- Пестикът се изважда от микропруветката от 1,5 ml и се оставя в покой в продължение на около 10 секунди. След това се извършва визуална проверка на състоянието на суспензията.
 - Ако в суспензията се наблюдават парченца от черен дроб, операции 3) и 4) се повтарят, за да се приготви задоволителен хомогенат.
 - Суспендираният хомогенат от черен дроб се охлажда на охлаждащия статив с лед до центрофугирането.
 - Пестикът се сменя с нов за всеки хомогенат.
 - Всички екземпляри от черен дроб се хомогенизират с буфер за хомогенат в съответствие с гореописаната процедура.
- 3) Центрофугиране на суспендирания хомогенат от черен дроб
- Потвърждава се, че температурата на охладената центрофуга е ≤ 5 °C.
 - Микропруветките от 1,5 ml, съдържащи суспендирания хомогенат от черен дроб, се поставят в охладената центрофуга (коригира се балансът, ако е необходимо).
 - Суспендираният хомогенат от черен дроб се центрофугира при 13 000 g за 10 минути при ≤ 5 °C. Ако супернатантите са достатъчно разделени обаче, центробежната сила и времето могат да бъдат коригирани според необходимостта.
 - След центрофугирането се проверява дали супернатантът е достатъчно разделен (повърхностен слой: липиди, среден слой: супернатант, дънен слой: чернодробна тъкан). Ако разделянето не е достатъчно, суспензията се центрофугира отново при същите условия.
 - Всички екземпляри се отстраняват от охладената центрофуга и се подреждат на охлаждащия статив с лед по реда на екземпляра. Внимава се да не се суспендира повторно някой от разделените след центрофугирането слоеве.
- 4) Събиране на супернатанта
- На статива за епруветки се поставят четири микропруветки от 0,5 ml за съхранение на супернатанта.
 - От всеки супернатант (разделен като междинен слой) с микропипетата се вземат по 30 μ l и се поставят в една микропруветка от 0,5 ml. Внимава се да не се вземе от липидите в повърхностния слой, или от чернодробната тъкан в дънния слой.
 - Супернатантът се събира и се поставя в други микропруветки от 0,5 ml по същия начин, както е описано по-горе.
 - Останалата част от супернатанта се събира с микропипетата (ако е осъществимо: ≥ 100 μ l). След това супернатантът се поставя в оставащата микропруветка от 0,5 ml. Внимава се да не се вземе от липидите в повърхностния слой, или от чернодробната тъкан в дънния слой.
 - Капачката на микропруветката от 0,5 ml се затваря и върху етикета се отбелязва обемът на супернатанта. След това микропруветките се охлаждадат незабавно върху охлаждащия статив с лед.
 - Върхът на пипетата се сменя с нов за всеки супернатант. Ако към върха остава прикрепено голямо количество липиди, той се сменя незабавно с нов, за да се избегне замърсяване на екстракта от черен дроб с мазнини.

▼ **M7**

- Цялото количество центрофугиран супернатант се поставя в четири микроепруветки от 0,5 ml съгласно процедурата, описана по-горе.
- След поставянето на супернатантата в микроепруветките от 0,5 ml, всички те се поставят на статива за епруветки с етикет за идентификация, след което се замразяват незабавно във фризера. Ако концентрациите на VTG се измерват непосредствено след предварителната обработка, една микроепруветка от 0,5 ml (съдържаща 30 µl супернатант) се съхранява на хладно на статива за епруветки и се прехвърля на работното място, където се провежда изпитването с ELISA. В такъв случай оставащите микроепруветки се поставят на стативите за епруветки и се замразяват във фризера.
- След събирането на супернатанта остатъкът се отстранява по подходящ начин.

Съхранение на образците

Микроепруветките от 0,5 ml, съдържащи супернатанта от хомогената от черен дроб, се съхраняват при ≤ -70 °C до използването им за ELISA.

Процедура 3A: Вземане на кръвна проба от опашна вена/артерия от зеброво данио

Непосредствено след анестезията опашното стъбло се разрязва напречно и кръвта се отстранява от опашната артерия/вена с хепаринизирана микрокапилярка за хематокрит. Обемът на кръвта варира от 5 до 15 µl в зависимост от размера на рибата. Равен обем буфер с аprotинин (6 µg/ml в PBS) се добавя към микрокапилярката и плазмата се разделя от кръвта чрез центрофугиране (5 минути при 600 g). Плазмата се събира в епруветките за изпитването и се съхранява при температура – 20 °C до анализа за VTG или за други представляващи интерес белтъци.

Процедура 3B: Кръвна проба чрез сърдечна пункция при зеброво данио

За да се избегне съсирването на кръвта и разграждането на белтъците, пробите се вземат във фосфатно буферизиран физиологичен разтвор (PBS), съдържащ хепарин (1 000 единици/ml) и протеазния инхибитор аprotинин (2 TPU/ml). Като съставки за буфера са препоръчителни хепарин (амониева сол) и лиофилизиран аprotинин. За вземане на кръв се препоръчва спринцовка (1 ml) с фиксирана тънка игла (напр. Braun Omnikan-F). Спринцовката трябва да се запълни предварително с буфер (около 100 µl) за пълно елуиране на малките обеми кръв от всяка риба. Кръвните проби се вземат чрез сърдечна пункция. Първоначално рибата трябва да бъде анестезирана с MS-222 (100 mg/l). Правилното извършване на анестезията позволява на ползвателя да различава пулсирането на сърцето на зебровото данио. При извършването на сърдечната пункция буталото на спринцовката се държи под слаб натиск. Обемът на кръвната проба, който може да бъде взет, варира между 20 и 40 микролитра. След сърдечната пункция сместа от кръвта и буфера следва да бъде поставена в епруветката за изпитване. Плазмата се отделя от кръвта чрез центрофугиране (20 мин.; 5 000 g) и следва да се съхранява при –80 °C докато бъде необходима за анализ.

Процедура 3C: СОП: Зеброво данио, хомогенизиране на главата и опашката

1. Рибите се подлагат на анестезия и етаназия в съответствие с описанието на изпитването.
2. Главата и опашката се изрязват от рибата в съответствие с фигура 1.

Важно: Всички инструменти за дисекция и плоскостта за разрязване трябва да се промият и почистят по подходящ начин (например с 96 % етанол) между обработването на всяка отделна риба, за да се предотврати „замърсяване с вителогени“ от женски или индуцирани мъжки.

▼ M7

Фигура 1



3. Теглото на обединените глава и опашка от всяка риба се измерва с точност до един mg.
4. След като се претеглят, частите се поставят в подходящи епруветки (напр. 1,5 ml епендорфова епруветка) и се замразяват при -80°C до хомогенизирането, или направо се хомогенизират върху лед с два пластмасови пестика. (Могат да се използват други методи, ако те се извършват върху лед и резултатът е хомогенна маса). Важно: *Епруветките следва да бъдат номерирани по подходящ начин, така че главата и опашката от рибата да могат да бъдат свързани с частта от тялото, останала след изрязването им и използвана за хистология на гонадите.*
5. Когато се достигне до хомогенна маса, се добавя леденостуден **буфер за хомогенизиране** ⁽¹⁾ в количество, равно на 4 пъти теглото на тъканта. Продължава се работата с пестичите, докато сместа стане хомогенна. Важна забележка: *За всяка риба се използват нови пестичи.*
6. Пробите се поставят върху лед до центрофугирането при 4°C на 50 000 g за 30 min.
7. Използва се пипета за поставяне на порции от 20 μl супернатант в **поне две** епруветки, чрез потапяне на върха на пипетата под слоя мазнини на повърхността, и внимателно изсмукване на супернатанта, без фракции от мазнини или пелети.
8. Епруветките се съхраняват при -80°C до момента на употребата.

⁽¹⁾ Буфер за хомогенизиране:

— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % смес от инхибитори на протеаза (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl смес от инхибитори на протеаза.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) напр. от Bie & Berntsen, Дания.

— Смес от инхибитори на протеаза: От Sigma (за тъкани от бозайници) Продуктов номер P 8340.

БЕЛЕЖКА: Буферът за хомогенизирането следва да се използва на същия ден, в който е приготвен. По време на употреба се поставя върху лед.

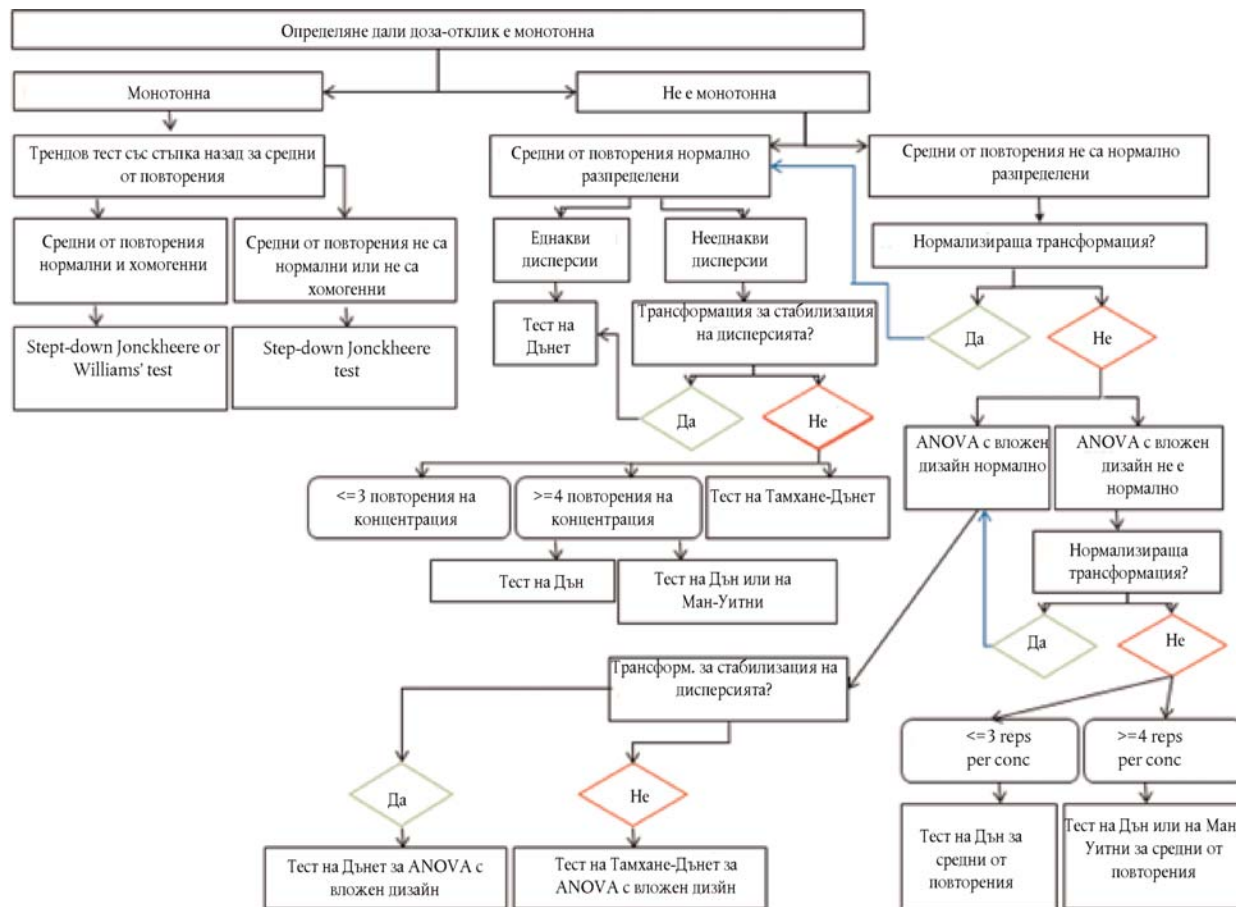
▼ M7*Допълнение 7***ПРОБИ С ВНЕСЕНА ДОБАВКА ВИТЕЛОГЕНИН И ЕТАЛОН,
КОЙТО Е РЕФЕРЕНТЕН МЕЖДУ РАЗЛИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ**

Всеки ден, в който се извършват изследвания за VTG, се анализира проба с внесена добавка с използване на еталон, който е референтен между различни изследвания. Вителогенинът, използван за получаването на еталона, референтен между различни изследвания, ще е от партида, различна от използваната за приготвяне на еталони за калибриране за извършваното изследване.

Пробата с внесена добавка се приготвя чрез добавяне на предварително известно количество от еталона, референтен между различни изследвания, в проба от плазма от контролен мъжки екземпляр. В пробата се внася добавка с цел постигане на концентрация на вителогенин между 10 и 100 пъти по-висока от очакваната концентрация на вителогенин в контролен мъжки екземпляр. Пробата от плазма от контролен мъжки екземпляр, в която се внася добавка, може да бъде от отделна риба, или може да бъде съставена от няколко риби.

Подпроба от плазма от контролен мъжки екземпляр, в която не е внесена добавка, се анализира най-малко в две гнезда с повторения. Пробата с внесена добавка също се анализира най-малко в две гнезда с повторения. Средното количество вителогенин в двете проби от плазма от контролен мъжки екземпляр, в които не е внесена добавка, се добавя към изчисленото количество вителогенин, внесено като добавка в пробите, за да се определи очаквана концентрация. Отношението на тази очаквана концентрация към измерената концентрация се протоколира заедно с резултатите от всеки набор от изследвания от този ден.

БЛОКОВА СХЕМА ЗА СТАТИСТИЧЕСКИЯ АНАЛИЗ



▼M7

В.49. ИЗПИТВАНЕ ЗА ОСТРА ТОКСИЧНОСТ ПРИ РИБНИ ЕМБРИОНИ (ТРЕ)

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 236 (2013 г.). Той описва изпитване за остра токсичност при рибни ембриони (ТРЕ) със зеброво данио (*Danio rerio*). Това изпитване е предназначено за определяне на остра токсичност на химикали върху стадите на развитие на рибните ембриони. Изпитването за остра токсичност при рибни ембриони се основава на проучвания и действия за валидиране, извършени по отношение на зеброво данио (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14). Изпитването за остра токсичност при рибни ембриони е успешно прилагано за широк спектър от химикали, проявяващи различни начини на действие, разтворимост, летливост и хидрофобност (прегледани в (15) и (16)).
2. Определенията, използвани за този метод за изпитване, са дадени в допълнение I.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

3. Новооплодените хайверни зърна на зеброво данио са изложени на изпитвания химикал за период от 96 часа. На всеки 24 часа до четири апикални наблюдения се записват като показатели за смъртност (6): i) коагулация на оплодените хайверни зърна; ii) отсъствие на образуване на сомити; iii) отсъствие на отделяне на опашката от жълтъчната торбичка; и iv) отсъствие на сърдечна дейност. В края на периода на експозиция острата токсичност се определя въз основа на положителен резултат при всяко от четирите записани апикални наблюдения и се изчислява LC_{50} .

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

4. Полезна информация относно специфичните за веществото свойства включват структурната формула, молекулното тегло, чистотата, стабилността във вода и на светлина, pK_a и K_{ow} , разтворимостта във вода и парното налягане, както и резултатите от изпитването за пълна биоразградимост (МИ В.4 (17) или МИ В.29 (18)). Разтворимостта и парното налягане може да се използват за изчисляване на константата по закона на Хенри, която ще покаже дали се очакват загуби на изпитвания химикал поради изпарение. Следва да е на разположение и надежден метод за анализ за характеризиране на веществото в изпитвания разтвор, с известна и протоколирана точност и граница на откриване.
5. Ако методът за изпитване се използва за изпитване на смес, нейният състав следва да бъде характеризиран, доколкото е възможно, напр. чрез химичната идентичност на нейните съставки, техния количествен състав и специфичните свойства на нейните съставки (вж. точка 4). Преди използването на метода за изпитване на смес с регулаторна цел следва да се обмисли дали той ще предостави приемливи за планираната регулаторна цел резултати.
6. Що се отнася до вещества, които могат да бъдат активирани чрез метаболизъм, има доказателства, че ембрионите на зеброво данио действително имат капацитет за биотрансформация (19) (20) (21) (22). Капацитетът за метаболизиране на рибните ембриони обаче невинаги е подобен на този на ювенилните или полово зрелите екземпляри. Например метаболитният прекурсор на токсични вещества алиловият алкохол (9) е пропуснат в изпитването за остра токсичност при рибни ембриони. Ето защо, ако има някакви признаци, че метаболити или други продукти на трансформацията от значение могат да бъдат потоксични от базовото съединение, също се препоръчва да се извърши изпитването с тези метаболити/продукти на трансформация, както и да се използват тези резултати, когато се правят заключения относно токсичността на изпитвания химикал, или алтернативно да се извърши друго изпитване, при което се отделя допълнително внимание на метаболизма.
7. За вещества с молекулно тегло $\geq 3kDa$, такива с много обемиста молекулярна структура, както и вещества, които причиняват забавяне на излюпването, което може да възпрепятства или намаля експозицията след излюпването, не се очаква ембрионите да са чувствителни поради ограничената бионаличност на веществото и може да са подходящи други изпитвания за токсичност.

▼ M7**ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО**

8. За да са приемливи резултатите от изпитването, се прилагат следните критерии:
- а) Общият процент на оплождане на всички събран хайвер следва да бъде $\geq 70\%$ в изпитваната партида.
 - б) Температурата на водата следва да се поддържа на 26 ± 1 °C в камерите за изпитване по всяко време по време на изпитването.
 - в) Общата преживяемост на ембрионите в отрицателната контрола (контрола на вода за разреждане) и, когато е приложимо, в контролата на разтворителя следва да бъде $\geq 90\%$ до края на експозицията от 96 часа.
 - г) Експозицията на положителната контрола (например 4,0 mg/l 3,4-дихлороанилин за зebroво данио) следва да доведе до минимална смъртност от 30 % в края на експозицията от 96 часа.
 - д) Скоростта на излюпване в отрицателната контрола (и контролата на разтворителя, ако е приложимо) следва да е $\geq 80\%$ в края на 96-часовата експозиция.
 - е) В края на 96-часовата експозиция концентрацията на разтворения кислород в отрицателната контрола и най-високата изпитвана концентрация следва да бъде $\geq 80\%$ от стойността на насищане.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

9. Преглед на препоръчителните условия на поддържане и изпитване е наличен в допълнение 2.

Апаратура

10. Нужно е следното оборудване:
- а) съдове за рибите, направени от химични инертни материали (напр. стъкло) и с подходящ капацитет по отношение на препоръчителната гъстота на зареждане (вж. „Поддържане на риби за размножаване“, точка 14);
 - б) инвертен и/или бинокулярен микроскоп с капацитет за поне 80-кратно увеличение. Ако температурата в стаята, която се използва за запис на наблюденията, не може да се регулира на 26 ± 1 °C, температурата трябва да се поддържа с помощта на напречно задвижвана платформа с контролирана температура или други методи;
 - в) камери за изпитване; например стандартни 24-гнездни плаки с дълбочина от около 20 mm. (вж. „Камери за изпитване“, точка 11);
 - г) например самозалепващо фолио за покриване на 24-гнездните плаки;
 - д) инкубатор или климатизирано помещение с контролирана температура, позволяващи да се поддържа температура от 26 ± 1 °C в гнездата (или камерите за изпитване);
 - е) рН-метър;
 - ж) кислородомер;
 - з) уред за определяне твърдостта на водата и проводимостта;
 - и) вана за хвърляне на хайвера: вани от стъкло, неръждаема стомана или други инертни материали; телена мрежа (размер на решетката $2 \pm 0,5$ mm) от неръждаема стомана или друг инертен материал, за защита на вече поставените хайверни зърна; субстрат за хвърляне на хайвер (например изкуствени растения от инертен материал) (МИ В.48, допълнение 4а, (23));
 - й) пипети с разширени отвори за събиране на хайверните зърна;

▼ M7

- к) стъклени съдове за приготвяне на различни изпитвани концентрации и на водата за разреждане (стъкленици, градуирани колби, градуирани цилиндри и градуирани пипети) или за събиране на хайвера на зеброво данио (например стъкленици, блюда кристализатори);
- л) ако за провеждане на изпитването се използват алтернативни системи на експозиция, като проточно (24) или пасивно дозиране (25), са необходими подходящи съоръжения и оборудване.

Камери за изпитване

11. Следва да се използват камери за изпитване от стъкло или полистирен (например 24-гнездни плаки с капацитет на запълване от 2,5—5 ml на гнездо). В случай на съмнения за адсорбция върху полистирен (например при неполярни планарни вещества с високо K_{OW}), за да се намалят загубите, дължащи се на адсорбцията (26), следва да се използват инертни материали (стъкло). Камерите за изпитване следва да бъдат произволно разположени в инкубатора.

Вода и условия на изпитване

12. Препоръчително е водата за поддържане да се разрежда, за да се постигне равнище на твърдост, характерно за голяма част от повърхностните води. Водата за разреждане следва да се приготвя от възстановена вода (27). Постигнатата степен на твърдост следва да бъде еквивалентна на 100—300 mg/l $CaCO_3$, за да се предотврати прекомерно утаяване на калциев карбонат. Може да се използват и други добре характеризирани повърхностни или изворни води. Възстановената вода може да се адаптира до вода за поддържане с ниска твърдост чрез разреждане с дейонизирана вода до съотношение от 1:5 за постигане на минимална твърдост от 30—35 mg/l $CaCO_3$. Преди да се добави изпитваният химикал, водата се аерира до насищане с кислород. В хода на изпитването температурата в гнездата следва да се поддържа на $26 \pm 1^\circ C$. Стойността на рН следва да бъде в границите между рН 6,5 и 8,5 и в рамките на този диапазон да не варира с повече от 1,5 единици в хода на изпитването. Ако се очаква, че рН няма да се запази в този диапазон, следва да се направи корекция на рН преди началото на изпитването. Корекцията на рН следва да се направи по такъв начин, че концентрацията на изходния разтвор да не се промени в значителна степен и да не се предизвика никаква химична реакция или утаяване на изпитвания химикал. Препоръчва се използването на хлороводород (HCl) и натриев хидроксид (NaOH), за да се коригира рН в разтворите, съдържащи изпитвания химикал.

Разтвори за изпитване

13. Разтворите за изпитване на избраните концентрации могат да се приготвят например чрез разреждане на изходен разтвор. Изходните разтвори следва да се приготвят за предпочитане чрез просто смесване или разбъркване на изпитвания химикал във водата за разреждане, като се използват механични средства (например разклащане и/или с помощта на ултразвук). Ако разтварянето на изпитвания химикал във вода е трудно, трябва да бъдат следвани процедурите, описани в ръководството на ОИСР с насоки № 23 за боравене с трудни вещества и смеси (28). Използването на разтворители следва да се избягва, но в някои случаи може да се изисква с цел да се получи изходен разтвор с подходяща концентрация. Когато за подготовката на изходния разтвор се използва разтворител, неговата окончателна концентрация не следва да превишава 100 µl/l и следва да бъде еднаква във всички съдове за изпитване. Когато се използва разтворител, се изисква допълнителна контрола на разтворителя.

Поддържане на риби за размножаване

14. За получаването на хайвер се използват риби за развъждане от неекспониран див екземпляр на зеброво данио с добре документиран процент на оплождане на хайвера. По рибите следва да няма макроскопски симптоми на инфекции и заболявания и те следва да не са били подлагани на медикаментозно (интензивно или профилактично) лечение 2 месеца преди хвърлянето на хайвера. Рибите за развъждане се поддържат в аквариуми с препоръчителен капацитет на зареждане от 1 l вода на риба и фиксиран светъл период с продължителност от 12—16 часа (29) (30) (31) (32) (33). Оптималната скорост на филтруване следва да бъде коригирана; прекалено високата скорост на филтруване причинява сериозни смущения на водата и следва да се избягва. За

▼ **M7**

условията на хранене вж. допълнение 2. Следва да се избягва прехранването и качеството на водата и чистотата на аквариумите следва да се следят редовно и, ако е необходимо, да се възстановяват до изходното състояние.

Изпитване за пригодност

15. В качеството си на референтен химикал 3,4-дихлороанилинът (използван в изследванията за валидиране (1) (2)), следва да бъде изпитан в пълния диапазон концентрация-отклик с цел да се провери чувствителността на използвания рибен шам, като за предпочитане е това да става два пъти годишно. Всяка лаборатория, която за първи път започва да извършва такъв анализ, следва да използва референтния химикал. Лабораториите могат да използват този химикал за доказване на своята техническа компетентност за извършване на изследването преди предаване на данните за регулаторни цели.

Получаване на хайвер

16. Хайверът на зеброво данио може да бъде набавен чрез използване на групи за хвърляне на хайвер (в отделни резервоари за хвърляне на хайвер) или чрез масово хвърляне на хайвера (в резервоарите за поддържане). Що се отнася до групите за хвърляне на хайвер, мъжките и женските риби (напр. в съотношение 2:1) в дадена група за развъждане се поставят в резервоари за хвърляне на хайвер няколко часа преди настъпването на тъмнина в деня преди изпитването. Тъй като при зебровото данио групите за хвърляне на хайвер могат понякога да не успеят да хвърлят хайвера си, препоръчва се едновременно използване на най-малко три резервоара за хвърляне на хайвер. С цел да се предотврати евентуално отклонение в генетично отношение хайверните зърна се събират, смесват и подбират на произволен принцип от минимум три групи за развъждане.
17. Що се отнася до събирането на хайверните зърна, ваните за хвърляне на хайвер се поставят в резервоарите за хвърляне на хайвер или в резервоарите за поддържане преди настъпване на тъмната част на денонощието в деня преди изпитването или преди настъпване на светлата част на денонощието в деня на изпитването. С цел да се попречи на полово зрелите екземпляри зеброво данио да изядат хайвера ваните за хвърляне на хайвер се покриват с мрежа от инертен материал с подходящ размер на отворите (прибл. $2 \pm 0,5$ mm). Ако се сметне за необходимо, към мрежата могат да бъдат фиксирани изкуствени растения, изработени от инертен материал (например пластмаса или стъкло), за да служат като стимул за хвърляне на хайвер (3) (4) (5) (23) (35). Следва да се използват устойчиви пластмасови материали, от които не се освобождават вещества (например фталати). Чифтосването, хвърлянето на хайвера и оплождането се извършват в рамките на 30 минути след настъпване на светлата част на денонощието, след което ваните със събраните хайверни зърна могат да бъдат внимателно отстранени. След като бъдат събрани от ваните за хвърляне на хайвер се препоръчва хайверните зърна да се изплакват с възстановена вода.

Делене на хайвера

18. При температура от 26°C след около 15 минути оплоденият хайвер преминава през първия стадий на делене и последващи синхронни деления на 4, 8, 16 и 32 клетъчни бластомера (вж. допълнение 3) (35). В тези стадии оплодените хайверни зърна могат ясно да бъдат идентифицирани чрез образуването на бластула.

ПРОЦЕДУРА**Условия на експозиция**

19. Двадесет ембриона на концентрация (един ембрион на гнездо) се експонират на изпитвания химикал. Експозицията следва да бъде такава, че да позволява поддържане на ± 20 % от номиналната концентрация на химикала в хода на изпитването. Ако в статична система това не е възможно, следва да се приложи полустатичен интервал на обновяване (например обновяване на всеки 24 часа). В тези случаи концентрациите на експозицията поне за най-високите и най-ниските изпитвани концентрации трябва да се проверяват в началото и в края на всеки интервал на експозиция (вж. точка 36). Ако поддържане на концентрация на експозицията в интервал ± 20 % от номиналната концентрация не е възможно, всички концентрации трябва да бъдат измерени в началото и в края на всеки интервал на експозиция (вж. точка 36). При обновяване следва да се внимава ембрионите да продължават да бъдат покрити с

▼ M7

малка част от старите изпитвани разтвори, за да се предотврати тяхното изсушаване. Планът на изпитването може да бъде адаптиран, така че да изпълнява изискванията за изпитване на конкретни вещества (*напр.* проточни (24) или пасивни системи за дозиране (25) за лесно разградими или силно адсорбиращи се вещества (29) или други за летливи вещества (36) (37)). Във всеки случай следва да се подхожда внимателно, за да се минимизира стресът на ембрионите. Камерите за изпитване следва да бъдат кондиционирани с изпитваните разтвори поне 24 часа преди началото на изпитването. Условието на изпитване са обобщени в допълнение 2.

Концентрации на изпитване

20. Обикновено, за да се отговори на статистическите изисквания, са необходими пет концентрации на изпитвания химикал, равно отдалечени една от друга с кратност, която не надвишава 2,2. Следва да се представи обосновка, ако са използвани по-малко от пет концентрации. За предпочитане е най-високата изпитвана концентрация да предизвиква 100 % смъртност, а най-ниската изпитвана концентрация да няма видим ефект, както е посочено в точка 28. Изпитване за определяне на обхвата, проведено преди окончателното изпитване, позволява да се избере подходящият диапазон на концентрация. За определяне на обхвата обикновено се използват по десет ембриона на концентрация. Указанията по-долу се отнасят за извършване на изпитване в 24-гнездни плаки. Ако за изпитването се използват различни камери (например малки блюда на Петри) или се изпитват повече концентрации, указанията трябва съответно да бъдат коригирани.
21. Подробности и визуални инструкции относно разпределението на концентрациите във всички 24-гнездни плаки са предоставени в точка 27 и в допълнение 4, фигура 1.

Контроли

22. Изискват се контроли на водата за разреждане както под формата на отрицателна контрола, така и под формата на вътрешни контроли на плаките. Ако при вътрешната контрола на плаката се констатира повече от един мъртъв ембрион, плаката се отхвърля, като по този начин се намалява броят на концентрациите, използвани за определянето на LC₅₀. При отхвърляне на цялата плака способността за оценка и разграничаване на наблюдаваните ефекти може да бъде затруднена, особено ако е отхвърлена плаката с контролата на разтворител или плака, в която са засегнати и третираните ембриони. В първия случай изпитването трябва да се повтори. Във втория загубата на цяла третирана група или групи поради смъртност във вътрешната контрола може да ограничи възможността за оценка на ефектите и за определяне на стойностите на LC₅₀.
23. Положителна контрола при фиксирана концентрация от 4 mg/l 3,4-дихлороанилин се извършва за всяка партида хайвер, която се използва за изпитване.
24. Когато се използва разтворител, на разтворителя се излага допълнителна група от 20 ембриона в отделна 24-гнездна плака, която служи за контрола на разтворителя. За да може изпитването да се счете за приемливо, следва да се докаже, че разтворителят не оказва значимо въздействие по време на излюпването и преживяването и че не предизвиква каквито и да било други неблагоприятни ефекти върху ембрионите (вж. точка 8в).

Начало на експозицията и продължителност на изпитването

25. Изпитването започва възможно най-скоро след оплождането на хайвера и приключва след 96-часова експозиция. Ембрионите следва да бъдат потапяни в изпитваните разтвори преди да започне дробенето на бластодиска или най-късно до 16-ия клетъчен стадий. За да се сведе до минимум забавянето на началото на експозицията, не по-късно от 90 минути след оплождането на случаен принцип се избират хайверни зърна, чийто брой надвишава поне два пъти необходимия за третираната група, и те се пренасят в съответните концентрации и контроли (напр. в 100-милилитрови блюда кристализатори; хайверните зърна следва да бъдат изцяло покрити).
26. До 180 минути след оплождането живите оплодени хайверни зърна следва да бъдат отделени от неоплодените хайверни зърна и да се

▼ **M7**

прехвърлят в 24-гнездни плаки, предварително подготвени в продължение на 24 часа и напълнени с 2 ml/гнездо прясно приготвени изпитвани разтвори. С помощта на стереомикроскоп (за предпочитане с ≥ 30 -кратно увеличение) се подбират оплодени хайверни зърна в процес на дробене, при които не се наблюдават явни недостатъци при дробенето (например асиметрия, образуване на везикули), нито нараняване на хориона. Относно събирането и разделянето на хайверните зърна вж. допълнение 3, фиг. 1 и 3 и допълнение 4, фиг. 2.

Разпределение на хайверните зърна в 24-гнездните плаки

27. В гнездните плаки се поставя следният брой хайверни зърна (вж. също допълнение 4, фиг. 1)
- 20 хайверни зърна на една плака за всяка изпитвана концентрация;
 - 20 хайверни зърна на една плака като контрола на разтворител (ако е необходимо);
 - 20 хайверни зърна на една плака като положителна контрола;
 - 4 хайверни зърна във водата за разреждане във всяка от горните плаки като вътрешна контрола на плаката;
 - 24 хайверни зърна на една плака във вода за разреждане като отрицателна контрола.

Наблюдения

28. Апикалните наблюдения за всеки изпитван ембрион включват: коагулация на ембрионите, отсъствие на образуване на сомити, неотделяне на опашка и отсъствие на сърдечна дейност (таблица 1). Тези наблюдения се използват за определяне на леталитета: Всеки положителен резултат при някой от тези фактори за наблюдения означава, че ембрионът на зебровото данио е мъртъв. Освен това излюпването в третираните и контролните групи се записва ежедневно, като се започва от 48-ия час. Наблюденията се записват на всеки 24 часа до края на изпитването.

Таблица 1.

Апикални наблюдения за остра токсичност при зеброво данио 24—96 часа след оплождането.

	Време на експозиция			
	24 часа	48 часа	72 часа	96 часа
Коагулирани ембриони	+	+	+	+
Отсъствие на образуване на сомити	+	+	+	+
Неотделяне на опашката	+	+	+	+
Отсъствие на сърдечна дейност		+	+	+

29. *Коагулация на ембриона*: Коагулираните ембриони са млечнобели и под микроскопа изглеждат тъмни (вж. допълнение 5, фиг. 1). Броят на коагулираните ембриони се определя след 24, 48, 72 и 96 часа.
30. *Отсъствие на образуване на сомити*: При температура от 26 ± 1 °C при нормално развит ембрион на зеброво данио след 20 часа се образуват около 20 сомита (вж. допълнение 5, фигура 2). Нормално развитият ембрион извършва спонтанни движения (контракции от единия до другия край). Спонтанните движения са индикация за образуването на сомити. Отсъствието на сомити се записва след 24, 48, 72 и 96 часа. Отсъствието на образувани сомити след 24 часа може да се дължи на общо забавяне на развитието. Образуването на сомити следва да навакса забавянето най-късно след 48 часа. Ако това не стане, ембрионите се считат за мъртви.
31. *Неотделяне на опашката*: При нормално развиващ се ембрион на зеброво данио отделянето на опашката (вж. допълнение 5, фигура 3)

▼ M7

от жълтѝка се наблюдава след удължаване на задната част на тялото на ембриона. Неотделянето на опашка се записва след 24, 48, 72 и 96 часа.

32. *Отсъствие на сърдечна дейност:* При нормално развиващ се ембрион на зеброво данио при температура от 26 ± 1 °C сърдечната дейност започва да се долавя след 48 часа (вж. допълнение 5, фигура 4). Записът на тази крайна точка изисква особено внимание, тъй като нередовната (хаотична) сърдечна дейност *не* следва да се записва като летална. Освен това доловима сърдечна дейност без циркулация в абдоминалната аорта се счита за нелетална. При записа на тази крайна точка ембрионите, при които липсва сърдечна дейност, следва да се наблюдават под микроскоп при минимално увеличение 80X в продължение на поне една минута. Отсъствието на сърдечна дейност се записва след 48, 72 и 96 часа.
33. Процентът на излюпване във всички третирани и контролни групи следва да се записва от 48-ия час нататък и да се протоколира. Въпреки че излюпването не се използва като крайна точка за изчисляване на LC_{50} , то осигурява експозиция на ембриона без потенциална бариерна функция на хориона, и в този смисъл може да помогне за интерпретацията на данните.
34. Подробни описания на нормалното (35) и примери за ненормално развитие на ембриони на зеброво данио са представени в допълнения 3 и 5.

Аналитични измервания

35. В началото и в края на изпитването се измерват рН, общата твърдост и проводимостта в контролата(ите) и в най-високата концентрация на изпитвания химикал. В системите с полустатично обновяване рН следва да се измерва преди и след обновяването на водата. Концентрацията на разтворения кислород се измерва в края на изпитването в отрицателните контроли и в най-високата изпитвана концентрация с жизнеспособни ембриони, като тя следва да съответства на критериите за валидност на изпитването (вж. точка 8e). Ако съществуват опасения, че температурата в различните 24-гнездни плаки е различна, температура се измерва в три произволно избрани съда. За предпочитане е температурата да се записва непрекъснато по време на изпитването или, като минимум, всеки ден.
36. В статична система концентрацията на изпитвания химикал следва да се измерва, като минимум, в най-високите и най-ниските изпитвани концентрации, но за предпочитане във всички третирания в началото и в края на изпитването. В полустатичните (с обновяване) изпитвания, при които концентрацията на изпитвания химикал се очаква да остане в рамките на ± 20 % от номиналната стойност, се препоръчва като минимум да се анализират най-високите и най-ниските изпитвани концентрации, когато са прясно приготвени, и непосредствено преди обновяване. За изпитвания, при които концентрацията на изпитвания химикал не се очаква да остане в рамките на ± 20 % от номиналната стойност, трябва да се анализират всички изпитвани концентрации, когато са прясно приготвени, и непосредствено преди обновяване. Ако обемът не е достатъчен за анализ, може да бъде от полза изпитваните разтвори да се обединят, или да се използват сурогатни камери от същия материал и със същото съотношение обем/повърхностна площ като това при 24-гнездните плаки. Силно се препоръчва резултатите да се основават на измерени концентрации. Когато концентрациите не се задържат в рамките на 80—120 % от номиналната концентрация, концентрациите с определено въздействие следва да бъдат изразени спрямо средната геометрична стойност на измерените концентрации; за повече информация вж. глава 5 от Ръководството на ОИРС с насоки за изпитване за токсичност във водна среда на трудни вещества и смеси (28).

ГРАНИЧНО ИЗПИТВАНЕ

37. Като се използват процедурите, описани в настоящия метод за изпитване, може да се направи гранично изпитване при 100 mg/l от изпитвания химикал или при неговата граница на разтворимост в средата за изпитване (в зависимост от това коя е по-ниска), за да се

▼ **M7**

докаже, че LC_{50} е по-голяма от тази концентрация. Граничното изпитване следва да се извърши с 20 ембриона в третиранията, положителната контрола и, ако е необходимо, в контролата на разтворител, и с 24 ембриона в отрицателната контрола. Ако процентът на леталитет при изпитваната концентрация надвишава смъртността в отрицателната контрола (или контролата на разтворител) с 10 %, следва да се извърши цялостно проучване. Всички наблюдавани ефекти следва да бъдат записани. Ако при отрицателната контрола (или контролата на разтворител) смъртността надвишава 10 %, изпитването е невалидно и следва да се повтори.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Обработка на резултатите**

38. В настоящото изпитване отделните гнезда се считат за независими повторения за целите на статистическия анализ. Дяловете на ембрионите с поне един положителен резултат при апикалните наблюдения на 48-ия и/или 96-ия час се начертават срещу изпитваните концентрации. При изчисляването на наклоните на кривата, стойностите на LC_{50} и доверителните граници (95 %) следва да се прилагат подходящи статистически методи (38) и следва да се направи консултация с документа на ОИСП относно „Съвременни подходи за статистически анализ на данни за екотоксичност“ (39).

Протокол от изпитването

39. Протоколът от изпитването следва да включва следната информация:

Изпитван химикал:

Вещества с една съставка

- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- химична идентификация, като например наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, код SMILES или InChI, структурна формула, чистота, химична идентичност на онечистванията, доколкото е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н. (включително съдържание на органичен въглерод, ако е приложимо).

Вещество с повече съставки, UVCB и смеси:

- определени, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Изпитвани организми:

- научно наименование, порода, източник и метод на събиране на оплодените хайверни зърна и последваща обработка.

Условия на изпитване:

- използвана процедура на изпитване (например полустатична с обновяване);
- времетраене на осветлението;
- план на изпитването (например брой на камерите за изпитване, видове контроли);
- качествени характеристики на водата за поддържане на рибите (например рН, твърдост, температура, проводимост, разтворен кислород);
- концентрация на разтворен кислород, рН, обща твърдост, температура и проводимост на изпитваните разтвори в началото и след 96 часа;
- метод за приготвяне на изходните разтвори и разтворите за изпитване, както и честота на обновяване;

▼ M7

- обосновка за използването на разтворител и обосновка за избора на разтворител, ако е различен от вода;
- номиналните изпитвани концентрации и резултатите от всички анализи за определяне на концентрацията на изпитвания химикал в съдовете за изпитване; следва да се отчете коефициентът на аналитичния добив на метода и границата на количественото определяне;
- доказателства, че контролите изпълняват общите критерии за валидност по отношение на преживяването;
- процент на оплождане на хайверните зърна;
- процент на излюпване в третираните и контролните групи.

Резултати:

- максималната концентрация, при която не е настъпила смъртност през периода на изпитването;
- минималната концентрация, при която е отчетена 100-процентова смъртност през периода на изпитването;
- кумулативна смъртност за всяка концентрация в препоръчаните часове за наблюдение;
- стойности на LC₅₀ след 96 часа (и като вариант след 48 часа) за смъртността с доверителни граници от 95 %, ако е възможно;
- графика на кривата концентрация-смъртност в края на изпитването;
- смъртност в контролите (отрицателни контроли, вътрешни контроли на плаките, както и използваните положителна контрола и всякаква контрола на разтворител);
- данни за резултатите от всяко от четирите апикални наблюдения;
- проява и описание на морфологичните и физиологичните аномалии, ако има такива (вж. примерите, предоставени в допълнение 5, фигура 2);
- инциденти в хода на изпитването, които биха могли да повлияят на резултатите;
- статистически анализ и обработка на данните (пробит-анализ, модел на логистична регресия и средногеометричната стойност за LC₅₀);
- наклон и доверителни граници на регресията на (трансформираната) крива концентрация-отклик.

Евентуално отклонение от метода за изпитване и съответните обяснения.

Дискусия и интерпретиране на резултатите.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.
- (2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.
- (3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute

▼ M7

- fish LC₅₀ test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.
- (4) ISO (2007) International Standard Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.
 - (5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) — a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.
 - (6) Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test — preliminary results. ATLA 22, 12-19.
 - (7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.
 - (8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.
 - (9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.
 - (10) Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.
 - (11) Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-diethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: 401-406.
 - (12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.
 - (13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryolaval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.
 - (14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. and Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.
 - (15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J. (2013) Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768—1783.
 - (16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196—209
 - (17) Глава В.4 от настоящото приложение: Пълна биоразградимост.
 - (18) Глава В.29 от настоящото приложение: Пълна биоразградимост, CO₂ в херметично затворени съдове.
 - (19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.

▼ M7

- (20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Reprod. Toxicol.* 33: 133-141.
- (21) Incardona, J.P., Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 257: 242-249.
- (22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253: 244-252.
- (23) Глава В.48 от настоящото приложение: Краткосрочно изследване на размножаването при риби. Вж. допълнение 4а.
- (24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. in vitro* 23: 1436-1442.
- (25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4097-4102.
- (26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1676-1682.
- (27) ISO (1996) International Standards. Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Достъпен на: [<http://www.iso.org>].
- (28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
- (29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. *J. Fish Biol.* 10: 121-173.
- (30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5th edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.
- (31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>
- (32) Европейска Комисия (2007 г.), Препоръка на Комисията от 18 юни 2007 г. относно насоки за настаняване и грижи за животни, използвани за опитни и други научни цели (нотифицирано под номер C(2007) 2525) (текст от значение за ЕИП) [<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:BG:PDF>]
- (33) Европейски съюз (2010 г.), Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 г. относно защитата на животните, използвани за научни цели. Официален вестник на Европейския съюз ОВ L 276, 20.10.2010 г., стр. 33.

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:BG:PDF>
- (34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). *J. Appl. Ichthyol.* 2: 173-181.

▼ M7

- (35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203: 253-310.
- (36) Глава В.2 от настоящото приложение: *Daphnia* sp., Изпитване за остра имобилизация.
- (37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1970-1978
- (38) ISO (2006) International Standard. Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Достъпен на: [<http://www.iso.org>].
- (39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.
- (40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper „Fish embryo toxicity assays“. UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.

▼ M7*Допълнение 1*

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Апикална крайна точка: Причиняване на въздействие на равнище популация.

Бластула: Клетъчна формация около животинския полюс, която обхваща известна част от жълтъка.

Химикал: Вещество или смес

Епиболия: е масивна пролиферация, касаеща основно епидермални клетки в стадия на гаструлация на ембриона и тяхното движение от дорзалната към вентралната страна, което служи за интернализиране на ентодермалните клетъчни слоеве чрез процес, напомнящ инвагинация, и инкорпориране на жълтъка в ембриона.

Проточно изпитване: Изпитване с постоянен поток на изпитвани разтвори през системата за изпитване по време на периода на експозицията.

Вътрешна контрола на плаката: Вътрешна контрола, при която се използват 4 пълни с вода за разреждане гнезда на всяка 24-гнездна плака с цел установяване на потенциално замърсяване на плаката от производителя или от изследователя по време на процедурата, както и евентуално въздействие на плаката, което може да повлияе на резултата от изпитването (например температурен градиент).

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Международен съюз по чиста и приложна химия).

Вода за поддържане: Вода, в която се осъществява развъждането на полово зрелите риби.

Медианна летална концентрация (LC₅₀): Концентрация на изпитвания химикал, която се счита за летална при 50 % от изпитваните организми в хода на изпитването.

Полустатично изпитване с обновяване: Изпитване с редовно обновяване на изпитваните разтвори след определени периоди (напр. на всеки 24 часа).

SMILES: Спецификация за опростено линейно въвеждане на молекули

Сомит: При развиващите се ембриони на гръбначните животни сомитите са мезодермални маси, разположени напречно на невралната тръба, от които в крайна сметка се развива дермата (дерматом), скелетната мускулатура (миотом) и гръбначният стълб (склеротом).

Статично изпитване: Изпитване, при което изпитваните разтвори остават непроменени през целия период на изпитването.

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

UVCB: Вещества с неизвестен или променлив състав, сложни продукти от реакции или биологични материали

▼ M7

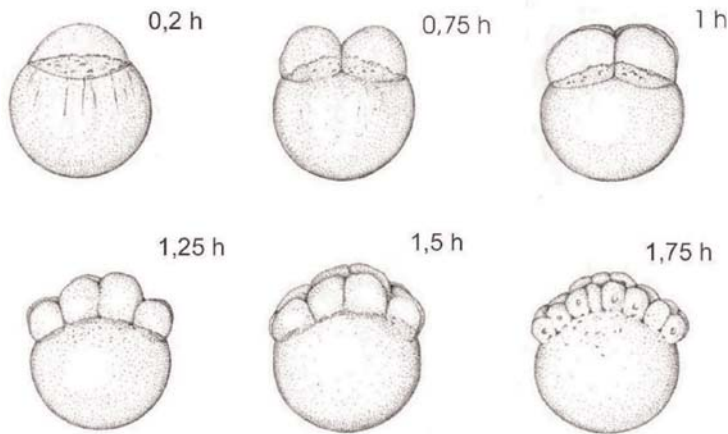
Допълнение 2

ПОДДЪРЖАНЕ, РАЗМНОЖАВАНЕ И ТИПИЧНИ УСЛОВИЯ ЗА ПРОВЕЖДАНЕ НА ИЗПИТВАНИЯ ЗА ОСТРА ТОКСИЧНОСТ ПРИ ЕМБРИОНИ НА ЗЕБРОВО ДАНИО

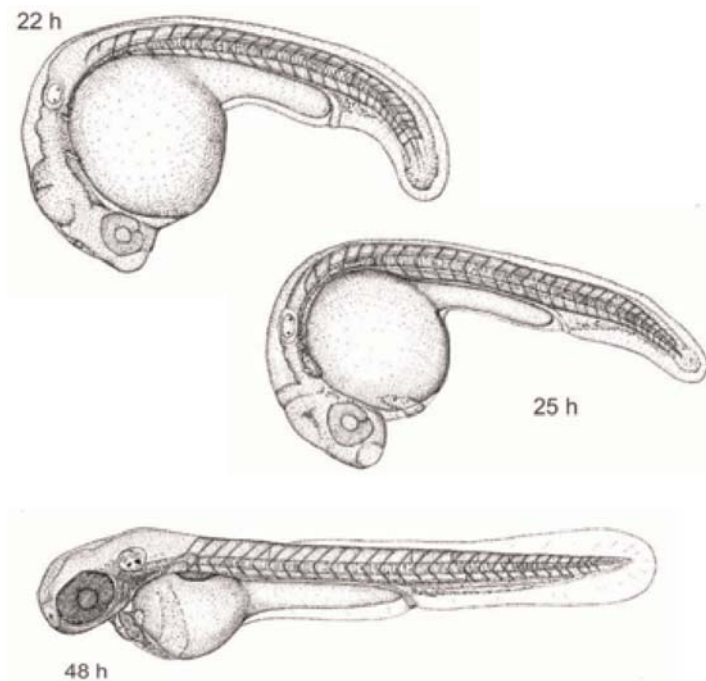
Зеброво данио (<i>Danio rerio</i>)		
Произход на вида.	Индия, Бирма, п-в Малака, Суматра	
Полов диморфизъм	Женски: изпъкнал корем при носене на хайвера Мъжки: по-тънки, с оранжев нюанс между сини надлъжни ивици (особено очевидни на равнището на ананалната перка)	
Режим на хранене	Суха храна във вид на люспи (максимум 3 % от теглото на рибата на ден) 3 до 5 пъти дневно; допълнително науплии от артемии (<i>Artemia spec.</i>) и/или малки водни бълхи с подходящ размер от незамърсен източник. Храненето с жива храна осигурява източник за облагородяване на средата и следователно, когато е възможно, следва да се дава жива храна. За да се гарантира оптимално качество на водата, излишната храна и изпражненията следва да се отстраняват приблизително един час след хранене.	
Приблизително тегло на половозряла риба	Женски: 0,65 ± 0,13 g Мъжки: 0,5 ± 0,1 g	
Поддържане на възрастните риби	Осветление	Луминесцентни крушки (широк спектър); 10—20 µE/m ² /s, 540—1080 lux, или 50—100 ft-c (заобикалящи равнища на осветеност в лабораторията); 12—16 часа фотопериод
	Температура на водата	26 ± 1 °C
	Качество на водата	O ₂ ≥ 80 % наситеност, твърдост: напр. ~30—300 mg/l CaCO ₃ , NO ₃ ⁻ : ≤ 48 mg/l, NH ₄ ⁺ и NO ₂ ⁻ : < 0,001 mg/l, остатъчен хлор < 10 µg/l, общо органичен хлор < 25 ng/l, pH = 6,5—8,5
	Допълнителни критерии за качество на водата	Твърди частици < 20 mg/l, общо органичен въглерод < 2 mg/l, общо органофосфорни пестициди < 50 ng/l, общо органохлорни пестициди плюс полихлорирани бифенили < 50 ng/l
	Размер на контейнера за поддържане	напр. 180 l, 1 риба/l
	Пречистване на вода	Постоянно (филтруване с активен въглен); други възможности включват комбинация между полустатично поддържане с обновяване или проточна система с непрекъснато обновяване на водата
	Препоръчително съотношение между мъжките и женските риби за размножаване	2:1 (или масово хвърляне на хайвер)
Аквариуми за хвърляне на хайвера	например 4-литрови аквариуми със стоманена решетка на дъното и изкуствени растения като стимул за хвърляне на хайвера; външни нагреватели или масово хвърляне на хайвера в аквариумите за поддържане	
Структура и външен вид на хайвера	Стабилен хорион (т.е. силно прозрачен, нелепкав, диаметър ~ 0,8—1,5 mm)	
Процент на хвърляне на хайвера	Една половино зряла женска хвърля поне 50—80 хайверни зърна на ден. В зависимост от породата процентът на хвърляне на хайвера може да бъде значително по-висок. Процентът на оплождане следва да е ≥ 70 %. При риби, които за първи път хвърлят хайвер, процентът на оплождане на хайвера при първите няколко хвърляния може да е по-нисък.	
Тип изпитване	Статично, полустатично с обновяване, проточно, температура от 26 ± 1 °C, 24 часово аклиматизиране на камерите за изпитване (например 24-гнездни плаки с 2,5—5 ml на кухня)	

▼ M7

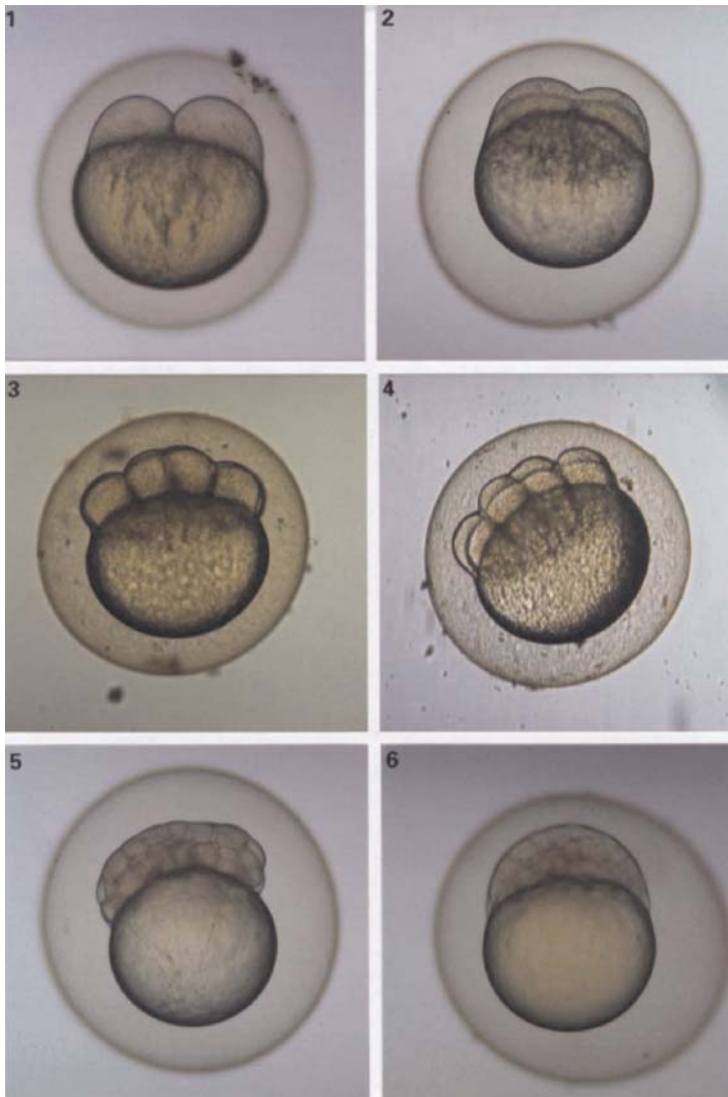
Допълнение 3

НОРМАЛНО РАЗВИТИЕ НА ЕМБРИОНИ НА ЗЕБРОВО ДАНИО
ПРИ 26°C

Фиг. 1: Избрани ранни етапи на развитие на зеброво данио (*Danio rerio*): 0,2—1,75 часа след оплождане (от Kimmel *и др.*, 1995 г. (35)). Времевата последователност на нормалното развитие може да се отчита за диагностициране както на оплождането, така и на жизнеспособността на хайверните зърна (вж. точка 26: Подбор на оплодени хайверни зърна).



Фиг. 2: Избрани късни етапи на развитие на зеброво данио (*Danio rerio*) (дехорионален ембрион за оптимизиране на видимостта): 22—48 часа след оплождането (от Kimmel *и др.*, 1995 г. (35)).

▼ M7

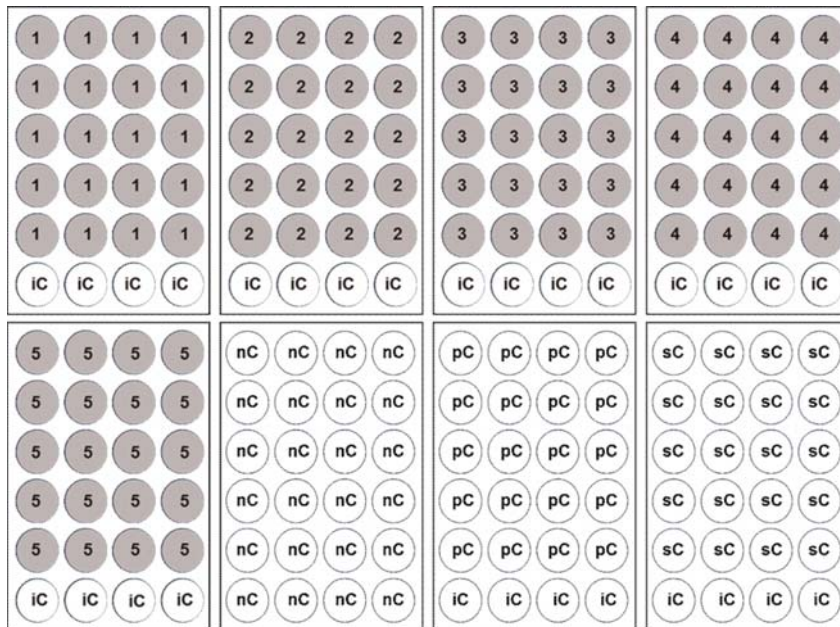
Фиг. 3: Нормално развитие на ембриони на зebрово данио (*Danio rerio*): (1) 0,75 часа, 2-клетъчен етап; (2) 1 час, 4-клетъчен етап; (3) 1,2 часа, 8-клетъчен етап; (4) 1,5 часа, 16-клетъчен етап; (5) 4,7 часа, започва епиволия; (6) 5,3 часа, приблизително 50 % епиволия (от Braunbeck и Lammer 2006 г. (40)).

▼ M7

Допълнение 4

Фиг. 1

Разположение на 24-гнездните плаки



1-5 = пет концентрации на изпитване/химикал;

nC = отрицателна контрола (вода за разреждане);

iC = вътрешна контрола на плаката (вода за разреждане);

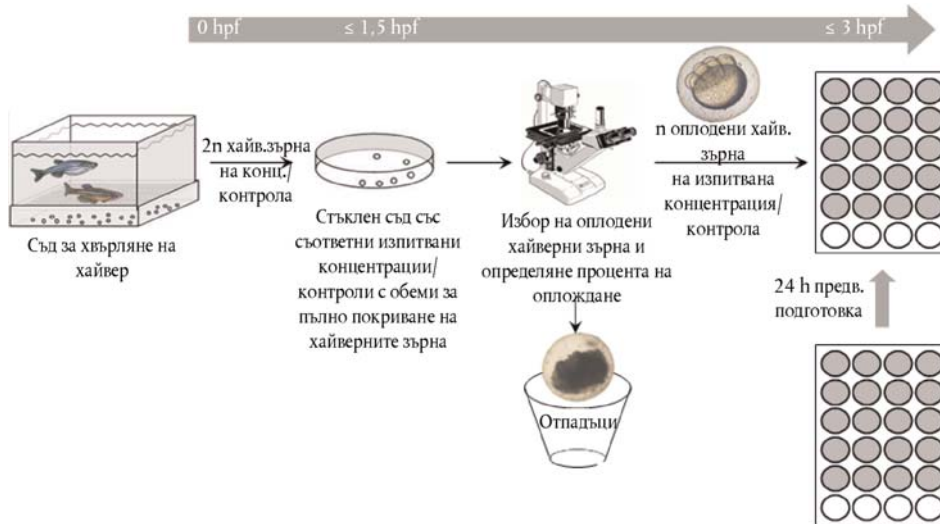
pC = положителна контрола (3,4-DCA 4 mg/l);

sC = контрола на разтворител

▼ M7

Фиг. 2

Схема на процедурата на изпитване за остра токсичност при ембриони на зebрово данио (отляво надясно): получаване на хайверни зърна, събиране на хайверни зърна, предварителна експозиция веднага след оплождането в стъклени съдове, подбор на оплодени хайверни зърна с инвертен или бинокулярен микроскоп и разпределение на оплодените яйца в 24-гнездни плаки, подготвени със съответните концентрации на изпитване/контроли, n = брой на хайверните зърна, необходими за концентрацията на изпитване/контролата (тук 20), hpf = часове след оплождането.



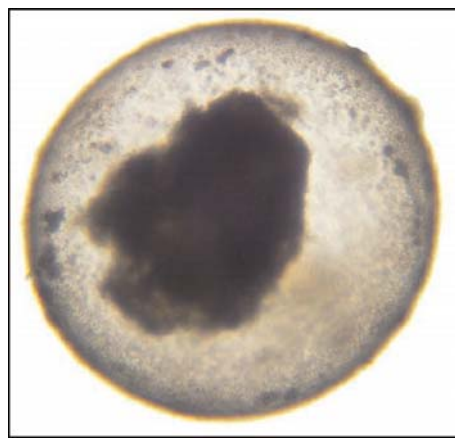
▼ M7

Допълнение 5

**АТЛАС НА ЛЕТАЛНИТЕ КРАЙНИ ТОЧКИ ЗА ИЗПИТВАНЕТО ЗА
ОСТРА ТОКСИЧНОСТ ПРИ ЗЕБРОВО ДАНИО**

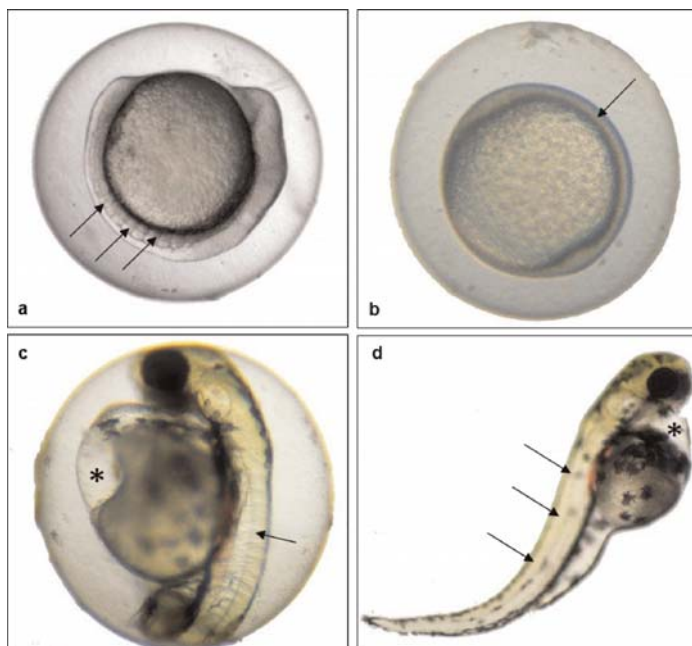
Следните апикални крайни точки са показател за остра токсичност и вследствие на това смърт на ембрионите: коагулация на ембриона, неотделяне на опашката, отсъствие на образуване на сомити и отсъствие на сърдечна дейност. За илюстрация на тези крайни точки са избрани следните микрографики.

Фиг. 1

Коагулация на ембриона

При наблюдаване в светло поле коагулираните ембриони на зебровото данио показват различни непрозрачни включения.

Фиг. 2

Отсъствие на образуване на сомити

▼ **M7**

Въпреки че е изостанал в развитието си с приблизително 10 часа, 24-часовият ембрион на зеброво данио в (а) показва добре развити сомити (→), докато ембрионът в (б) не показва никакви признаци на образуване на сомити (→). Въпреки ясно изразения оток на жълтъчната торбичка (*) 48-часовият ембрион на зеброво данио във (в) показва отчетливо образуване на сомити (→), докато 96-часовият ембрион на зеброво данио, изобразен в (г), не показва никакви признаци на образуване на сомити (→). Да се отбележи също така гръбначното изкривяване (сколиоза) и перикардния оток (*) на ембриона в (г).

Фиг. 3

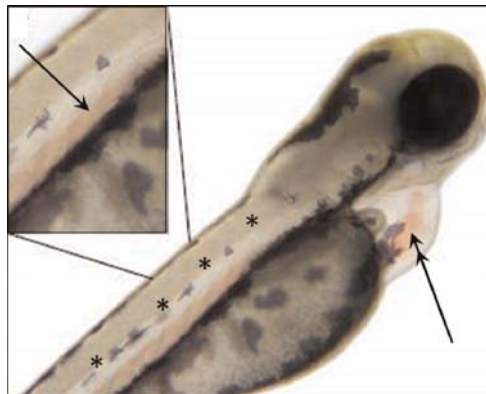
е отделяне на опашна пъпка в страничен изглед



(а: →; ембрион на зеброво данио на 96 часа). Да се отбележи също така отсъствие на очна пъпка (*).

Фиг. 4

Отсъствие на сърдечна дейност



Отсъствието на сърдечна дейност по дефиниция трудно се илюстрира с микрограф. Има показания за отсъствие на сърдечна дейност при липса на сърдечни конвулсии (двойна стрелка). Неподвижността на кръвните клетки например в абдоминалната аорта (→ в подложката) не е индикатор за отсъствие на сърдечна дейност. Да се отбележи също така отсъствието на образуване на сомити при този ембрион (*, хомогенен вместо сегментиран вид на мускулните тъкани). Времето за наблюдение, необходимо за да се регистрира отсъствие на сърдечна дейност, следва да е поне една минута при минимално увеличение от 80×.

▼ **M7****B.50. ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ БЕЗ СЕДИМЕНТИ ПРИ MYRIOPHYLLUM SPICATUM**

УВОД

1. Този метод за изпитване съответства на насоките за изпитване № 238 на ОИСП (2014 г.). Той е създаден с цел оценка на токсичността на химикалите върху *Myriophyllum spicatum*, подводно двусемеделно растение от семейство *Haloragaceae*. Той се основава на съществуващ метод за изпитване на ASTM (1), модифициран като система за изпитване без седименти (2) с цел оценка на присъщата екотоксичност на изпитваните химикали (независимо от начина, по който изпитваният химикал се разпределя между водата и седимента). Система за изпитване без седименти се характеризира с ниска степен на аналитична сложност (само във водната фаза) и резултатите могат да бъдат анализирани паралелно и/или в сравнение с тези, получени от изпитването при *Lemna* sp. (3); в допълнение изискването за стерилни условия позволява въздействието на микроорганизмите и водораслите (поглъщане/разграждане на химикала и т.н.) да се поддържа на възможно най-ниско равнище. Настоящото изпитване не замества други изпитвания за токсичност във водна среда; то следва по-скоро да ги допълва с цел да се постигне по-пълна оценка на опасностите и рисковете за водните растения. Методът за изпитване е валидиран чрез кръгово изпитване (4).
2. Описани са подробности от изпитването с обновяване (полустатично) на изпитвания разтвор и без обновяване (статично) на изпитвания разтвор. В зависимост от целите на изпитването и регулаторните изисквания се препоръчва прилагането на полустатичния метод, например за вещества, които бързо се отстраняват от разтвора в резултат от изпарение, адсорбция, фоторазграждане, хидролиза, утаяване или биоразграждане. Допълнителни насоки са дадени в (5). Настоящият метод за изпитване се прилага за вещества, за които методът на изпитване е валидиран (вж. подробности в протокола от кръговото изпитване (4)) или за формулировки или известни смеси; при изпитване на смеси съставките им следва да бъдат в максимална степен идентифицирани и количествено определени. Методът за изпитване без седимент при *Myriophyllum spicatum* допълва изпитването за токсичност вода-седимент при *Myriophyllum spicatum* (6). Преди използването на метода за изпитване на смес с регулаторна цел следва да се обмисли дали той може да предостави подходящи за целта резултати и ако да — защо. Подобни съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

3. Постоянно растящи растителни култури от вида *Myriophyllum spicatum* (само в модифицирана среда на Andrews, вж. допълнение 2) се отглеждат под формата на монокултури в различни концентрации на изпитвания химикал за срок от 14 дни в система за изпитване без седименти. Целта на изпитването е да се определят количествено свързаните с химикала въздействия върху вегетативния растеж през този период въз основа на оценки на избрани измервани променливи. Измерваните променливи са ръстът на поника, страничните разклонения и корените, както и промените в свежото и сухото тегло и увеличението на броя на прешлените. В допълнение отличителни качествени изменения на изпитваните организми, като например деформиране, или хлороза и некроза, проявяващи се под формата на пожълтяване или бяло и кафяво оцветяване, също се вземат предвид. С цел количествено определяне на свързани с химикала въздействия растежът в изпитваните разтвори се сравнява с този в контролите и концентрацията, при която се осъществява x % инхибиране на растежа, се определя и се изразява като EC_x ; „ x “ може да бъде всяка стойност в зависимост от нормативните изисквания, например EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} . Следва да се отбележи, че оценките на EC_{10} и EC_{20} са надеждни и подходящи само при тестове, при които коефициентите на вариация в контролните растения падат под оценяваното равнище на въздействие, т.е. за устойчива оценка на EC_{20} коефициентите на вариация следва да бъдат <20 %.
4. Следва да се определи както средната специфична скорост на растежа (прогнозирана въз основа на оценка на дължината на основния поник и три допълнителни измервани променливи) и добива (прогнозиран въз

▼ M7

основа на увеличението на дължината на основния поник и три допълнителни измервани променливи) от нетретирани и третирани растения. Специфичната скорост на растежа (r) и добива (y) впоследствие се използват за определяне съответно на $E_r C_x$ (напр. $E_r C_{10}$, $E_r C_{20}$, $E_r C_{50}$) и $E_y C_x$ (напр. $E_y C_{10}$, $E_y C_{20}$, $E_y C_{50}$).

5. В допълнение най-ниската концентрация, при която се наблюдава въздействие (LOEC), и концентрацията без наблюдавано въздействие (NOEC) могат да бъдат определени статистически.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНИЯ ХИМИКАЛ

6. Следва да е наличен метод за анализ с достатъчна чувствителност за количествено определяне на изпитвания химикал в средата на изпитване. Информацията относно изпитвания химикал, която може да бъде полезна при установяване на условията на изпитване, включва структурната формула, чистотата и онечистванията, водоразтворимостта, стабилността във вода и на светлина, константата на киселинна дисоциация (pK_a), коефициента на разпределение октанол-вода (K_{ow}), парното налягане и биоразградимостта. Разтворимостта във вода и парното налягане може да се използват за изчисляване на константата по закона на Хенри, която ще покаже дали се очакват значителни загуби на изпитвания химикал през периода на изпитването. Това ще помогне да се разбере дали следва да се предприемат определени стъпки за контролиране на тези загуби. Когато информацията за разтворимостта и стабилността на изпитвания химикал е несигурна, се препоръчва те да бъдат оценени в условията на изпитване, т.е. среда на растеж, температура, режим на осветеност, които ще бъдат използвани при изпитването.
7. Контролът на pH в изпитваната среда е особено важен, например при изпитване на метали или вещества, които са неустойчиви на хидролиза. Допълнителни насоки за изпитване на химикали, чиито физични и химични свойства затрудняват тяхното изпитване, са дадени в ръководство на ОИСП с насоки (5).

ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

8. За да бъде валидно изпитването, времето за удвояване на дължината на основния поник в контролата трябва да е под 14 дни. Използването на средата и на условията на изпитване, описани в настоящия метод на изпитване, позволяват постигането на този критерий с помощта на статичен или полустатичен режим на изпитване.
9. Средната стойност на коефициента на вариация на добива, въз основа на измервания на свежото тегло на поника (т.е. от началото до края на изпитването), и допълнителните измервани променливи (вж. точка 37) в контролните култури не надвишават 35 % между повторенията.
10. Повече от 50 % от повторенията на контролната група се съхраняват в стерилна среда през 14-дневния срок на експозицията, което означава без видимо замърсяване с други организми като водорасли, гъбички и бактерии (бистър разтвор). *Забележка:* Насоки за това как да се направи оценка на стерилността се предоставят в протокола от кръговото изпитване (4).

РЕФЕРЕНТЕН ХИМИКАЛ

11. Референтните химикали, като 3,5-дихлорофенола, използвани в кръговото изпитване (4), могат да се изпитват за проверка на процедурата на изпитване; данните от кръговото изпитване показват, че средните стойности на EC_{50} за 3,5-дихлорофенола при различните зависими променливи (вж. точки 37—41 от настоящия метод на изпитване) са между 3,2 и 6,9 mg/l (вж. протокола от кръговото изпитване за подробности относно доверителния интервал за тези стойности). Желателно е референтният химикал да се изпитва най-малко два пъти годишно или, когато изпитването се извършва по-рядко, да се извършва едновременно с определянето на токсичността на изпитвания химикал.

▼ **M7****ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА****Апаратура**

12. Цялото оборудване в контакт със средата на изпитване следва да е направено от стъкло или друг химически инертен материал. Стъклените съдове, използвани за отглеждане на култури и за изпитване, следва да бъдат почистени от химични замърсители, които биха могли да проникнат в средата на изпитване, както и да бъдат стерилни. Съдовете за изпитването следва да бъдат достатъчно високи, така че поникът в контролните съдове да може да расте във водна среда, без да достига повърхността на изпитваната среда в края на изпитването. Препоръчва се използването на дебелостенни тръби за изпитване от боросиликатно стъкло без отвор, с вътрешен диаметър около 20 mm и дължина 250 mm, и алуминиеви капачки.
13. Тъй като модифицираната среда на Andrews съдържа захароза (която стимулира растежа на гъбички и бактерии), изпитваните разтвори трябва да се приготвят в стерилни условия. Всички течности, както и оборудването, се стерилизират преди употреба. Стерилизация се извършва посредством обработка с горещ въздух (210 °C) в продължение на 4 часа или чрез обработка в автоклав в продължение на 20 минути при температура от 121 °C. В допълнение непосредствено преди употреба всички колби, блюда, чаши и т.н., както и останалото оборудване, се подлагат на обработка с пламък върху стерилна работна маса.
14. Културите и съдовете за изпитването не следва да се съхраняват заедно. Това се постига най-добре с използването на осигуряващи необходимите за растежа параметри на околната среда отделни климатични камери, инкубатори или помещения. Осветлението и температурата следва да могат да се контролират и да се поддържат на постоянно ниво.

Изпитван организъм

15. *Myriophyllum spicatum* е подводно двуседелно растение от семейство *Haloragaceae*. Между юни и август над водната повърхност се показват неразличими розово-бели цветове. Растенията са вкоренени в земята чрез система от устойчиви коренища и се срещат в цялото северно полукълбо в еутрофни, но незамърсени и наситени на калций спокойни води с кален субстрат. *Myriophyllum spicatum* предпочита сладките води, но може да бъде открито и в бракични води.
16. За изпитването за токсичност без седименти са необходими стерилни растения. Ако лабораторията за изпитване не разполага с редовни култури от *Myriophyllum spicatum*, стерилен растителен материал може да бъде получен от друга лаборатория или (нестерилен) растителен материал може да бъде взет на място или предоставен от търговски доставчик; ако растенията са събрани на място, следва да се предвиди извършване на таксономна проверка на вида. Ако са събрани на място или предоставени от търговски доставчик, растенията следва да се стерилизират (1) и съхраняват в култура в същата среда, която се използва за изпитването, в течение на минимум осем седмици преди да се използват. Полевите обекти за събиране на място на началните култури трябва да са без явни източници на замърсяване. Необходимо е специално внимание, за да се гарантира, че при събирането на *Myriophyllum spicatum* на място е взет правилният вид, особено в региони, където растението може да се кръстоса с други видове от същия род. Ако са получени от друга лаборатория, те следва да се съхраняват по същия начин в течение на минимум три седмици. За източника на растителен материал и вида, използвани в изпитването, следва винаги да се протоколира.
17. Качеството и еднородността на използваните за изпитването растения оказват значително влияние върху резултата от изпитването и поради това растенията следва да бъдат грижливо подбрани. Следва да се използват млади бързорастящи растения без видими увреждания или обезцветяване (хлороза). Подробности за подготвянето на изпитваните организми са дадени в допълнение 4.

Култивиране

18. За намаляване на честотата за поддържане на културата (например когато не са планирани изпитвания с *Myriophyllum* за известен период), културите могат да се съхраняват при намалено осветление и температура ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Подробности за култивирането са дадени в допълнение 3.

▼ M7

19. Най-малко от 14 до 21 дни преди изпитването достатъчно изпитвани организми се прехвърлят по стерилен начин в прясна стерилна среда и се култивират в течение на 14—21 дни при условията на изпитването като предкултура. Подробности за приготвянето на предкултури са дадени в допълнение 4.

Среда за изпитване

20. В система за изпитване без седименти се препоръчва използването само на една хранителна среда за *Myriophyllum spicatum*, както е описано в допълнение 2. За култивиране и изпитвания на *Myriophyllum spicatum* се препоръчва използването на модифицирана среда на Andrews, както е описано в (1). Модифицираната среда на Andrews се подготвя от пет отделно приготвени изходни хранителни разтвора с добавка на 3 % захароза. Подробности за приготвянето на средата са дадени в допълнение 2.
21. За получаването на разтворите за изпитване е необходима десетократна концентрация на модифицираната среда на Andrews (чрез разреждане, когато е уместно). Съставът на тази среда е даден в допълнение 2.

Разтвори за изпитване

22. Разтворите за изпитване обикновено се приготвят чрез разреждане на изходен разтвор. Изходните разтвори на изпитвания химикал обикновено се приготвят чрез разтваряне на химикала в деминерализирана (т.е. дестилирана или дейонизирана) вода. Хранителните вещества се добавят чрез използване на десетократната концентрация на модифицираната среда на Andrews.
23. Стерилизацията на изходните разтвори на изпитвания химикал може да се извършва в автоклав при температура от 121°C в продължение на 20 минути или чрез стерилно филтруване, при условие че използваната техника за стерилизация не променя характеристиките на изпитвания химикал. Изпитваните разтвори могат да се приготвят и в стерилна деминерализирана вода или среда при стерилни условия. При избора на процедурата на стерилизация на изходните разтвори на изпитвания химикал следва да се вземат под внимание термостабилността и адсорбцията върху различни повърхности. Поради това се препоръчва изходните разтвори да се приготвят в стерилни условия, т.е. за разтварянето на изпитвания химикал да се използва стерилен материал в стерилни условия (напр. стерилизация чрез фламбиране, шкафове с ламинарен поток и т.н.) в стерилна вода. Тази техника на приготвяне на стерилни изходни разтвори се използва както за веществата, така и за смесите.
24. Най-високата изпитвана концентрация на изпитвания химикал обикновено не следва да надвишава неговата разтворимост във вода при условията за провеждане на изпитването. За изпитвани химикали с малка водоразтворимост може да е необходимо да се приготви концентриран изходен разтвор или химикалът да се диспергира, като се използва органичен разтворител или диспергиращо средство, за да се улесни добавянето на точни количества от изпитвания химикал към средата на изпитване и да се подпомогне неговото диспергиране и разтваряне. Следва да се положат всички усилия, за да се избегне използването на такива материали. Следва да няма фитотоксичност в резултат на използването на спомагателни разтворители или диспергиращи средства. Например обичайно използваните разтворители, които не предизвикват фитотоксичност при концентрации до 100 µl/l, включват ацетон и диметилформамид. Ако се използва разтворител или диспергиращо средство, следва да бъде отчетена неговата крайна концентрация и тя да се поддържа на минимално ниво ($\leq 100 \mu\text{l/l}$), а всички третиранни и контролни проби следва да съдържат еднаква концентрация на разтворителя или диспергиращото средство. Допълнителни насоки относно използването на диспергиращи средства са дадени в (5).

Изпитвани и контролни групи

25. Предварителното познаване на токсичността на изпитвания химикал по отношение на *Myriophyllum spicatum*, например от изпитване за определяне на обхват, ще помогне при избирането на подходящи

▼ M7

изпитвани концентрации. В окончателното изпитване за токсичност обикновено следва да се използват пет (както в изпитването на потискането на растежа на видове от рода *Lemna*, глава С.26 от настоящото приложение) до седем изпитвани концентрации, подредени в геометрична прогресия; те следва да бъдат подбрани така, че стойностите на NOEC и EC₅₀ да попадат в обхвата на концентрациите (вж. по-долу). За предпочитане е кратността на разделяне между изпитваните концентрации да не надхвърля 3,2; могат обаче да се използват и по-големи стойности, при които кривата концентрация-отклик е полегата. Следва да се представи обосновка, ако са използвани по-малко от пет концентрации. При всяка от изпитваните концентрации следва да се използват най-малко пет повторения.

26. При задаването на обхвата на изпитваните концентрации (за изпитване за определяне на обхват и/или за окончателно изпитване за токсичност) трябва да се има предвид следното:

за определяне на EC_x изпитваните концентрации следва да обграждат стойността на EC_x, за да се гарантира подходяща доверителна вероятност. Например, ако се оценява EC₅₀, най-високата изпитвана концентрация следва да е по-висока от стойността на EC₅₀. Ако стойността на EC₅₀ попада извън обхвата на изпитваните концентрации, свързаните с нея доверителни интервали ще бъдат големи и правилната оценка за статистическата съгласуваност на модела може да не е възможна.

Ако целта е да се оцени LOEC/NOEC, най-ниската изпитвана концентрация следва да е достатъчно ниска, така че растежът да не бъде значимо по-малък от този в контролата. В допълнение най-високата изпитвана концентрация следва да е достатъчно висока, така че растежът да бъде значимо по-малък от този в контролата. Ако това не е така, изпитването ще трябва да се повтори с използване на различен обхват за концентрациите (освен ако най-високата концентрация е на границата на разтворимостта или максимално изискваната пределна концентрация, например 100 mg/l).

27. Всяко изпитване следва да включва контроли, които да са съставени от същата хранителна среда, изпитвани организми (избор на възможно най-хомогенен растителен материал — свежи странични разклонения от предкултурите, скъсени на 2,5 cm от основата), условия на околната среда и процедури, както в съдовете за изпитване, но без изпитвания химикал. Ако се използва спомагателен разтворител или диспергиращо средство, следва да бъде включена допълнително контролна третирана проба, като разтворителят/диспергиращото средство следва да присъстват в същата концентрация като тази в съдовете с изпитвания химикал. Броят на повторенията на съдове с контроли (и съдове с разтворител, ако е приложимо) следва да бъде поне десет.
28. Ако не се изисква определяне на NOEC, планът за изпитването може да бъде променен, като се увеличи броят на концентрациите и се намали броят на повторенията за всяка от концентрациите. Във всички случаи обаче броят на контролните повторения следва да е най-малко десет.

Експозиция

29. Свежите странични разклонения от предкултурата, скъсени на 2,5 cm от основата, се разпределят на случаен принцип в съдовете за изпитване при стерилни условия; всеки съд за изпитване следва да съдържа по едно странично разклонение с дължина от 2,5 cm с апикална меристема в единия край. Избраният растителен материал във всеки съд за изпитване следва да е с едно и също качество.
30. За минимизиране на влиянието на пространствените различия в интензитета на светлината и температурата се изисква схема за случаен подбор за разполагане на съдовете за изпитване в инкубатора. При извършване на наблюдения също се изискват блокова схема или промяна на разполагането на случаен принцип (или по-честа промяна на разполагането).
31. Ако предварително изпитване за стабилност показва, че концентрацията на изпитвания химикал не може да бъде поддържана (т.е. измерената концентрация пада под 80 % от първоначално измерената концентрация) за времето на изпитването (14 дни), се препоръчва полустатичен режим на изпитване. В този случай растенията следва да

▼ **M7**

бъдат експонирани в прясно приготвени разтвори за изпитване и за контроли най-малко един път по време на изпитването (например ден 7). Честотата на експониране в прясна среда ще зависи от стабилността на изпитвания химикал; може да е необходима по-голяма честота, за да се поддържа почти постоянна концентрация за силно нестабилни или летливи химикали.

32. Сценарият на експозиция чрез прилагане към листата (пръскане) не е включен в настоящия метод за изпитване.

Условия на изпитване

33. Следва да се използва топло и/или студено бяло флуоресцентно осветление за осигуряване на светлинно облъчване в диапазона от около $100\text{—}150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, когато се измерва като фотосинтетично активно излъчване (400—700 nm) в точки, чието разстояние от източника на светлина е еднакво с това на дъното на съда за изпитване (еквивалентно приблизително на 6 000—9 000 lux), като се използва цикъл светлина-тъмнина в съотношение 16:8 часа. Методът за детектиране и измерване на светлината, по-специално видът на сензора, оказва влияние върху измерваната стойност. Сферичните сензори (които реагират на светлина, излъчвана от всички ъгли над и под равнината на измерване) и „косинусовите“ сензори (които реагират на светлината, излъчвана от всички ъгли над равнината на измерване), са за предпочитане пред еднопосочните сензори и ще отчитат по-високи показания за описания тук вид многоточков източник на светлина.
34. Температурата в съдовете за изпитване следва да бъде $23^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$. Необходимо е да се обърне допълнително внимание на отклонението в стойността на рН в някои специални случаи, например когато се изпитват нестабилни химикали или метали; рН следва да остане в диапазон от 6—9. Вж. (5) за допълнителни насоки.

Продължителност

35. Изпитването се прекратява 14 дни след прехвърлянето на растенията в съдовете за изпитване.

Измервания и аналитични определения

36. В началото на изпитването дължината на основния поник на изпитвания организъм е 2,5 cm (вж. точка 29); тя се измерва с линейка (вж. допълнение 4) или чрез снимка и анализ на изображението. Дължината на основния поник на изпитвания организъм с обичаен или необичаен вид трябва да се определи в началото на изпитването, поне веднъж по време на 14-дневния период на експозиция и в края на изпитването. Забележка: Като алтернатива за онези, които не разполагат с анализ на изображения, ако работната маса е стерилизирана преди поставянето на растенията в съдовете за изпитване, за измерването на дължината на основния поник в началото и по време на изпитването може да се използва стерилна линейка. Следва да бъдат отбелязани промените в развитието на растението, например деформации на поничите, външния вид, показания за некроза, хлороза, пречупване или загуба на плавателността, както и в дължината и външния вид на корените. Следва да се отбележат и значими характеристики на средата на изпитване (например наличието на неразтворен материал, растеж на водорасли, гъбички и бактерии в съда за изпитване).
37. В допълнение към определянето на дължината на основния поник, по време на изпитването следва да се оценят и въздействията на изпитвания химикал върху три (или повече) от следните измервани променливи:
- i. Обща дължина на страничните разклонения
 - ii. Обща дължина на поника
 - iii. Обща дължина на корените
 - iv. Свежо тегло:
 - v. Сухо тегло:
 - vi. Брой на прешлените

▼ M7

- Забележка 1:* Наблюденията, направени по време на изпитването за определяне на обхвата, могат да помогнат при избора на относимите допълнителни измервания измежду изброените по-горе шест променливи.
- Забележка 2:* Много желателно е определянето на свежото и сухото тегло (параметри iv и v).
- Забележка 3:* Поради факта, че захарозата и светлината (експозицията на корените на светлина по време на изпитването) могат да окажат въздействие върху носителите на ауксин (хормон на растежа при растенията) и че някои химикали могат да имат начин на действие, подобен на този на ауксина, включването на крайните точки, свързани с измерването на корените (параметър iii), е под въпрос.
- Забележка 4:* Резултатите от кръговото изпитване показват високи коефициенти на вариация (> 60 %) за общата дължина на страничните разклонения (параметър i). Общата дължина на страничните разклонения във всички случаи е включена в измерването на общата дължина на поника (параметър ii), която показва по-приемливи коефициенти на вариация от порядъка на <30 %.
- Забележка 5:* Въз основа на горните съображения препоръчителните основни крайни точки за измерване са: обща дължина на поника, свежо тегло и сухо тегло (параметри ii, iv и v); използването на параметър vi — брой на прешлените — е оставено на преценката на лицето, провеждащо изследването.
38. Предимството на определянето на дължината на основния поник и на броя на прешлените е, че за всеки съд за изпитване и за всеки контролен съд това може да стане в началото, по време и в края на изпитването чрез заснемане и анализ на изображенията, като може да се използва също и (стерилна) линейка.
39. Общата дължина на страничните разклонения, общата дължина на корените (като сума от всички странични разклонения или корени) и общата дължина на поника (като сбор от дължината на основния поник и общата дължина на страничните разклонения) могат да бъдат измерени с линейка в края на експозицията.
40. Свежото и/или сухото тегло следва да се определят в началото на изпитването от проба от предкултурата, представителна по отношение на това, което се използва за начало на изпитването, както и в края на изпитването с растителен материал от всеки съд за изпитване и всеки контролен съд.
41. Общата дължина на страничните разклонения, общата дължина на поника, общата дължина на корените, свежото тегло, сухото тегло и броят на прешлените могат да се определят, както следва:
- i. Обща дължина на страничните разклонения: Дължината на страничните разклонения може да бъде определена чрез измерване на всички странични разклонения с линейка в края на експозицията. Общата дължина на страничните разклонения е сумата от всички странични разклонения във всеки съд за изпитване и всеки контролен съд.
 - ii. Обща дължина на поника: Дължината на основния поник може да бъде определена чрез анализ на изображенията или с помощта на линейка. Общата дължина на поника е сумата от общата дължина на страничните разклонения и дължината на основния поник във всеки съд за изпитване и всеки контролен съд в края на експозицията.
 - iii. Обща дължина на корените: Дължината на корените може да бъде определена чрез измерване на всички корени с линейка в края на експозицията. Общата дължина на корените е сумата от всички корени във всеки съд за изпитване и всеки контролен съд.
 - iv. Свежо тегло: Свежото тегло може да се определи чрез претегляне на изпитваните организми в края на експозицията. Целият растителен

▼ M7

материал от всеки съд за измерване и от всеки контролен съд се изплаква с дестилирана вода и се подсушава с целулозна хартия. След тази подготовка свежото тегло се определя чрез претегляне. Началната биомаса (свежо тегло) се определя въз основа на проба от изпитваните организми, взета от същата партида, която е използвана за инокулацията на съдовете за изпитване.

- v. Сухо тегло: След подготовката за определяне на свежото тегло изпитваните организми се изсушават при 60°C до постоянно тегло. Тази маса е сухото тегло. Началната биомаса (сухо тегло) се определя въз основа на проба от изпитваните организми, взета от същата партида, която е използвана за инокулацията на съдовете за изпитване.
- vi. Брой на прешлените: Броят се всички прешлени по дължината на основния поник.

Честота на измерванията и аналитичните определяния

42. Ако се използва схема за статично изпитване, рН на всяка третирана проба следва да се измери в началото и в края на изпитването. Ако се използва схема за полустатично изпитване, рН следва да се измерва във всяка партида от „свеж“ разтвор за изпитване преди всяко обновяване, както и в съответните „изчерпани“ разтвори.
43. Интензитетът на светлината следва да се измерва във вегетационната камера, в инкубатора или помещението в точки, които са на разстояние от източника на светлина, което е еднакво с това на изпитваните организми. Измерванията следва да се извършват най-малко веднъж по време на изпитването. Температурата на средата в заместващия съд, който се държи при същите условия във вегетационната камера, инкубатора или помещението, следва да се записва най-малко веднъж дневно (или постоянно от устройство за запис на данни).
44. По време на изпитването концентрациите на изпитвания(ите) химикал(и) се определят през подходящи интервали. При статични изпитвания минималното изискване е концентрациите да се определят в началото и в края на изпитването.
45. При полустатични изпитвания, при които концентрациите на изпитвания(ите) химикал(и) не се очаква да останат в рамките на $\pm 20\%$ от номиналната концентрация, е необходимо да се анализират всички пряно приготвени изпитвани разтвори и същите разтвори при всяко обновяване. Обаче при тези изпитвания, при които измерените начални концентрации на изпитвания(ите) химикал(и) не са в рамките на $\pm 20\%$ от номиналната, но за които може да се предоставят достатъчно доказателства, показващи че началните концентрации са повторяеми и стабилни (т.е. в обхват 80—120 % от началната концентрация), химичните определяния могат да се извършат само за най-високата и най-ниската изпитвана концентрация. Във всички случаи определянето на изпитваните концентрации преди обновяването е необходимо да се извършва само за един съд с повторение за всяка изпитвана концентрация (или в един съд, в който е обединено съдържанието на всички повторения).
46. Ако има доказателство, че изпитваната концентрация е била задоволително поддържана в рамките на $\pm 20\%$ от номиналната или измерваната първоначална концентрация през цялото време на изпитването, анализът на резултатите може да бъде базиран на номиналните или измерените първоначални стойности. Ако отклонението от номиналната или измерената първоначална концентрация не е в рамките на $\pm 20\%$, анализът на резултатите следва да се базира на средногеометричната стойност на концентрацията по време на експозицията или на модели, които описват намаляването на концентрацията на изпитвания химикал (5).

Гранично изпитване

47. При определени условия, например когато предварителното изпитване показва, че изпитваният химикал няма токсични въздействия при концентрации до 100 mg/l или до неговата граница на разтворимост в изпитваната среда или, ако става дума за формулировки, до неговата граница на диспергиране, може да бъде осъществено гранично

▼ **M7**

изпитване, включващо сравнение на отклика в контролна група и в една от третираните групи (100 mg/l или концентрация, равна на границата на разтворимост). Настоятелно се препоръчва това да е подкрепено с анализ на концентрацията на експозиция. Всички предходни условия на изпитване и критерии за валидност се прилагат и за гранично изпитване, с изключение на това, че броят на третираните повторения следва да се удвои. Растежът в контролната и третираната група може да се анализира чрез използване на статистически тест за сравняване на средните стойности, например t-тест на Стюдент.

ДАННИ И ПРОТОКОЛИРАНЕ**Зависими променливи**

48. Целта на изпитването е да се определят въздействията на изпитван химикал върху вегетативния растеж на *Myriophyllum spicatum*. Настоящият метод за изпитване описва две зависими променливи.
- а) **Средна специфична скорост на растеж**: тази зависима променлива се изчислява на базата на промените в логаритмите на дължината на основния поник и, допълнително, на базата на промените в логаритмите на други измервани параметри, т.е. обща дължина на поника, свежо тегло, сухо тегло или брой на прешлените с течение на времето (изразено за ден) в контролите и във всяка третирана група. **Забележка**: за измерваните параметри „обща дължина на страничните разклонения“ и „обща дължина на корените“ е невъзможно да се изчисли средна специфична скорост на растежа. В началото на изпитването изпитваният организъм все още няма странични разклонения, нито корени (въз основа на приготвянето на предкултурата); изчисляването на средната специфична скорост на растежа не може да се определи, когато отправната стойност е нула.
- б) **Добив**: тази зависима променлива се изчислява на базата на промените в дължината на основния поник и, допълнително, на базата на промените в други измервани параметри, т.е. за предпочитане обща дължина на поника, свежо тегло, сухо тегло или брой на прешлените и други параметри, ако се сметат за полезни — в контролите и във всяка третирана група до края на изпитването.
49. Оценките на токсичността следва да са базирани на дължината на основния поник и на измерването на още три допълнителни променливи (т.е. за предпочитане обща дължина на поника, свежо тегло, сухо тегло или брой на прешлените, вж. точка 37 и забележки 2, 4 и 5 към настоящата точка), тъй като някои химикали могат да оказват много по-голямо въздействие върху други измервани променливи, отколкото върху дължината на основния поник. Това въздействие не може да бъде открито само чрез изчисляване на дължината на основния поник.

Средна специфична скорост на растеж

50. Средната специфична скорост на растеж за определен период се изчислява като логаритмичното нарастване в променливите за растеж — дължина на основния поник и три допълнителни измервани променливи (т.е. обща дължина на поника, свежо тегло, сухо тегло или брой на прешлените) — като се използва формулата, дадена по-долу, за всяко повторение на контрола и третирания:

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

където:

μ_{i-j} : средна специфична скорост на растеж за времето от i до j

N_i : измервана променлива в съда за изпитване или в контролния съд в момента от време i

N_j : измервана променлива в съда за изпитване или в контролния съд в момента от време j

t : времеви интервал от i до j

▼ M7

Изчислява се средната стойност на скоростта на растеж заедно с оценки на дисперсията за всяка третирана и контролна група.

51. Средната специфична скорост на растеж следва да се изчисли за целия период на изпитване (времето „i“ в горната формула е началото на изпитването, а времето „j“ е края на изпитването). За всяка изпитвана концентрация и контрола се изчислява средната стойност на средната специфична скорост на растеж заедно с оценките на дисперсията. Допълнително следва да се оцени скоростта на растеж сектор по сектор с цел да се оценят въздействията на изпитвания химикал, които възникват в периода на експозиция (например чрез проверка на log-трансформираните криви на растежа).
52. Процентът на потискане на скоростта на растежа (I_r) тогава може да се изчисли за всяка изпитвана концентрация (третирана група) съгласно следната формула:

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

където:

% I_r : процентно потискане в средната специфична скорост на растеж;

μ_C : средна стойност на μ в контролата

μ_T : средна стойност на μ в третираната група

Добив

53. Въздействията върху добива се определят на базата на измерваната променлива дължина на основния поник и три допълнителни измервани променливи (т.е. за предпочитане обща дължина на поника, свежо тегло, сухо тегло или брой на прешлените), които присъстват във всеки съд за изпитване в началото и в края на изпитването. За свежото тегло или сухото тегло началната биомаса се определя на базата на проба от изпитваните организми, взета от същата партида, която е използвана за инокулацията на съдовете за изпитване. За всяка изпитвана концентрация и контрола се изчислява средната стойност на добива, заедно с оценките на дисперсията. Средното процентно потискане на добива (% I_y) може да се изчисли за всяка третирана група, както следва:

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

където:

% I_y : процентното намаление на добива

b_C : крайната биомаса минус началната биомаса за контролната група

b_T : крайната биомаса минус началната биомаса в третираната група

Време за удвояване

54. За определяне на времето за удвояване (T_d) на дължината на основния поник и придържането към този критерий за валидност при изследването (вж. точка 8) се използва следната формула с данните, получени от контролните съдове:

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

където μ е средната специфична скорост на растеж, определена според описанието в точки 50—52.

▼ **M7****Построяване на кривите концентрация-отклик**

55. Следва да се построят кривите концентрация-отклик, които свързват средното процентно потискане на зависимата променлива (I_r или I_y , изчислени както е показано в точка 53) и логаритъма на концентрацията на изпитвания химикал.

Оценка на EC_x

56. Оценка на EC_x следва да се основава на стойностите както на средната специфична скорост на растеж ($E_r C_x$), така и на добива ($E_y C_x$), всяка от които на свой ред следва да се основава на дължината на основния поник и евентуално на допълнителни измервани променливи (*m.e.* за предпочитане обща дължина на поника, свежо тегло, сухо тегло или брой на прешлените). Това е така, тъй като има химикали, които оказват различно въздействие върху общата дължина на поника и други измервани променливи. Следователно исканите параметри за токсичност са четири стойности на EC_x за всяко изчислено ниво x на потискане на растежа: $E_r C_x$ (дължина на основния поник); $E_r C_x$ (*m.e.*, за предпочитане обща дължина на поника, свежо тегло, сухо тегло или брой на прешлените); $E_y C_x$ (дължина на основния поник); и $E_y C_x$ (*m.e.*, за предпочитане обща дължина на поника, свежо тегло, сухо тегло или брой на прешлените).
57. Следва да се отбележи, че стойностите на EC_x , изчислени с помощта на тези две зависими променливи, не са сравними и тази разлика се разпознава, когато се използват резултатите от изпитването. Стойностите на EC_x , базирани на средната специфична скорост на растеж ($E_r C_x$), в повечето случаи ще бъдат по-високи от резултатите, базирани на добива ($E_y C_x$), ако се спазват условията за изпитване на настоящия метод за изпитване, което се дължи на математическата основа на съответните подходи. Тази разлика не следва да се интерпретира като разлика в чувствителността между двете зависими променливи — стойностите просто са различни от математическа гледна точка.

Статистически процедури

58. Целта е да се получи количествено съотношение концентрация-отклик чрез регресионен анализ. Може да се използва претеглена линейна регресия след извършване на линеаризираща трансформация на данните от отклика — например с пробит, или логит, или Вейбул модели (7), но предпочитаните процедури са тези на нелинейната регресия, които по-добре обработват неизбежните неравномерности и отклонения от гладките разпределения. При приближаване на нула или пълно инхибиране подобни неравномерности може да бъдат увеличени от трансформацията, като по този начин пречат на анализа (7). Следва да се отбележи, че стандартните методи на анализ с помощта на пробит, логит или Вейбул трансформации са предназначени за използване при двоични данни (например смъртност или преживяване) и следва да бъдат изменени, за да се приспособят към данните за скоростта на растежа или добива. Специфични процедури за определяне на стойности на EC_x от непрекъснати данни могат да се намерят в (8), (9) и (10).
59. За анализа на всяка от зависимите променливи се използва съотношението концентрация-отклик, за да се изчислят точковите оценки на стойностите на EC_x . По възможност следва да се определят 95 % доверителни граници за всяка от оценките. Съгласуваността на данните от отклика с регресионния модел следва да се оцени графично или статистически. Регресионният анализ следва да се извърши, като се използват откликите при индивидуалните повторения, а не средните стойности за третираните групи.
60. Оценка на EC_{50} и доверителните граници могат да се получат също и чрез използване на линейна интерполация с bootstrap процедура (10), ако наличните регресионни модели/методи са неподходящи за данните.
61. За оценяване на LOEC и следователно на NOEC е необходимо да се сравнят средните стойности от третиране, като се използват техники за дисперсионен анализ (ANOVA). Средната стойност за всяка концентрация след това се сравнява със средната стойност на контролата с помощта на съответния метод за множествени сравнения или трендов тест. Тестовете на Дънет или на Уйлямс могат да бъдат от полза (12) (13) (14) (15) (16). Необходимо е да се оцени дали е удовлетворено допускането при ANOVA за хомогенност на дисперсията. Тази оценка може да се извърши графично или чрез формален тест (15). Подходящи

▼ M7

са тестовете на Левин или на Бартлет. Невъзможността за удовлетворяване на допускането за хомогенност на дисперсиите понякога може да се коригира чрез логаритмична трансформация на данните. Ако хетерогенността на дисперсията е екстремална и не може да се коригира чрез трансформация, следва да се обмисли анализ с методи като теста на Йонкхере за определяне на тренд със стъпка назад. Допълнителни насоки относно определянето на NOEC могат да се намерят в (10).

62. В най-новите научни разработки е дадена препоръка концепцията за NOEC да бъде изоставена и заменена с базирани на регресия точкови оценки на EC_x . Не е установена подходящата стойност на x за това изпитване на *Myriophyllum*. Изглежда обаче, че диапазонът от 10 до 20 % е подходящ (в зависимост от избраната зависима променлива) и се предпочита да бъдат протоколирани както EC_{10} , така и EC_{20} и техните доверителни граници.

Протоколиране

63. Протоколът от изпитването включва следното:

Изпитван химикал

Вещество с една съставка:

- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- химична идентификация, като например наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, код SMILES или InChI, структурна формула, чистота, химична идентичност на онечистванията, доколкото е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н. (включително съдържание на органичен въглерод, ако е приложимо).

Вещество с повече съставки, UVCB или смес:

- определени, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Животински видове за изпитването

- Научно име и източник.

Условия на изпитване

- използвана процедура на изпитване (статична или полустатична);
- дата на началото на изпитването и неговата продължителност;
- среда за изпитване;
- описание на плана на проучването: съдове за изпитване и капаци, обем на разтворите, дължина на основния поник за един съд за изпитване в началото на изпитването;
- изпитвани концентрации (съответно номинална и измерена) и брой на повторенията за една концентрация;
- методи за приготвяне на изходните и изпитваните разтвори, включително използването на всякакви разтворители или диспергиращи средства.
- температура по време на изпитването;
- източник на светлина, интензитет на светлината и хомогенност;
- стойности на рН за изпитваните и контролните среди;
- метод за анализ на изпитвания химикал със съответните данни за оценка на качеството (изследвания за валидиране, стандартни отклонения или доверителни граници на анализите);

▼ M7

- методи за определяне на дължината на основния поник и други измервани променливи, например обща дължина на страничните разклонения, обща дължина на поника, обща дължина на корените, свежо тегло, сухо тегло или брой на прешлените.
- състояние на културата (стерилно или нестерилно) за всеки съд за изпитване и за всеки контролен съд при всяко наблюдение;
- всички отклонения от настоящия метод за изпитване.

Резултати

- необработени данни: дължина на основния поник и други измервани променливи във всеки съд за изпитване и всеки контролен съд при всяко наблюдение и извършен анализ;
- средни стойности и стандартни отклонения за всяка измервана стойност;
- криви на растежа за всяка измервана променлива.
- изчислените зависими променливи за всяко повторение на третиране със средните стойности и коефициент на вариация за повторенията;
- графично представяне на взаимовръзката концентрация-въздействие;
- оценки на токсичните крайни точки за зависимите променливи, например EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀, и свързаните доверителни интервали; Ако са изчислени, LOEC и/или NOEC и статистическите методи, използвани за тяхното определяне;
- ако е използван ANOVA, големината на въздействието, което може да се открие (например най-малката значима разлика);
- всяка стимулация на растеж, открита в което и да е третиране;
- всякакви визуални признаци за фитотоксичност, както и наблюдения на изпитваните разтвори;
- обсъждане на резултатите, включително всякакво влияние върху резултата от изпитването вследствие на отклонения от настоящия метод за изпитване.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.
- (2) Maletzki, D. *et al.* (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch*, No. 22, pp. 702–710.
- (3) Глава В.26 от настоящото приложение: Изпитване на потискането на растежа на видове от род *Lemna*,
- (3) OECD (2014), „*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.
- (4) OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.
- (5) Глава В.51 от настоящото приложение: Изпитване за токсичност вода-седимент при *Myriophyllum spicatum*
- (6) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.

▼ M7

- (7) Nyholm, N. *et al.* (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/2, pp. 157-167.
- (8) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.
- (9) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.
- (10) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.
- (11) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.
- (12) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.
- (13) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.
- (14) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.
- (15) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.

▼ **M7***Допълнение 1***ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

Биомаса е свежото и/или сухото тегло на живите организми, съдържащи се в една популация. В това изпитване биомасата е сумата от основния поник, всички странични разклонения и всички корени.

Химикал означава вещество или смес.

Хлороза е промяната на цвета от зелен на жълтеникав на изпитван организъм, по-специално на прешлените.

ЕС_x е концентрацията на изпитвания химикал, разтворен в изпитваната среда, която води до *x* % (например 50 %) намаляване на растежа на *Muri-orphyllum spicatum* в рамките на определен период на експозиция (който трябва да бъде посочен изрично, ако се отклонява от пълната или нормалната продължителност на изпитването). С оглед на еднозначно обозначаване на стойността на ЕС, изведена от скоростта на растежа или от добива, символът „E_tC^{cs}“ се използва за скоростта на растежа, а „E_yC^{cs}“ се използва за добива, следван от използваната измервана променлива, например E_tC (дължина на основния поник).

Растеж е увеличение на измерваната променлива, например дължина на основния поник, обща дължина страничните разклонения, обща дължина на поника, обща дължина на корените, свежо тегло, сухо тегло или брой на прешлените, за периода на изпитването.

Скорост на растеж (средна специфична скорост на растеж) е логаритмичното нарастване на измерваната променлива през периода на експозиция. *Забележка:* Зависимите променливи, свързани със скоростта на растежа, не зависят от продължителността на изпитването, доколкото моделът на растеж на неекспонираните контролни организми е експоненциален.

Най-ниска концентрация, при която се наблюдава въздействие (LOEC), е най-ниската изпитвана концентрация, при която за химикала се наблюдава статистически значимо въздействие за забавяне на растежа (при $p < 0,05$) в сравнение с контролата, в рамките на дадено време на експозиция. При все това, всички изпитвани концентрации над LOEC следва да имат вредно въздействие, равно или по-голямо от наблюдаваното при LOEC. Когато тези две условия не могат да бъдат удовлетворени, следва да се даде пълно обяснение за това как е била избрана LOEC (и следователно NOEC).

Измервани променливи са всички видове променливи, които се измерват с цел да се изрази крайната точка на изпитването с помощта на една или няколко различни зависими променливи. При този метод за изпитване измервани променливи са дължината на основния поник, общата дължина на страничните разклонения, общата дължина на поника, общата дължина на корените, свежото тегло, сухото тегло и броят на прешлените.

Монокултура е култура с един растителен вид.

Некроза е мъртва (т.е. бледа или тъмнокафява) тъкан на изпитвания организъм.

Концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC) е изпитваната концентрация непосредствено под LOEC.

Зависима променлива е променлива за оценяване на токсичността, получена от измервана променлива, описваща биомасата, чрез различни методи на изчисление. При настоящия метод за изпитване скоростите на растежа и добивът са зависими променливи, получени от измервани променливи като дължина на основния поник, обща дължина на поника, свежо тегло, сухо тегло или брой на прешлените.

Полустатично изпитване (с обновяване) е изпитване, при което изпитваният разтвор периодично се подменя на определени интервали по време на изпитването.

▼ M7

Статично изпитване е метод за изпитване без обновяване на изпитвания разтвор по време на изпитването.

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

Крайна точка на изпитване описва като цел на изпитването общия показател, който ще бъде изменен от изпитвания химикал в сравнение с контролата. При настоящия метод за изпитване крайната точка на изпитването е потискането на растежа, което може да се изрази чрез различни зависими променливи на базата на една или повече измервани променливи.

Среда за изпитване е напълно синтетичната среда на растеж, върху която растат изпитваните растения, когато са подложени на въздействието на изпитвания химикал. Изпитваният химикал обикновено се разтваря в средата за изпитване.

UVCB е вещество с неизвестен или променлив състав, сложен продукт от реакция или биологичен материал.

Добив е стойността на измервана променлива, чрез която се изразява биомасата в края на периода на експозиция минус измерваната променлива в началото на периода на експозиция. Забележка: Когато моделът на растеж на неекспонираните организми е експоненциален, зависимите променливи, базирани на добива, ще се понижат в хода на изпитването.

▼ **M7**

Допълнение 2

МОДИФИЦИРАНА СРЕДА НА ANDREWS ЗА ИЗХОДНИ КУЛТУРИ И ПРЕДКУЛТУРИ

Модифицираната среда на Andrews, която се изисква за изходните култури и предкултурите, се подготвя от пет отделно приготвени изходни хранителни разтвори с добавка на 3 % захароза.

Таблица 1

Състав на хранителния разтвор на Andrews: (Обозначение на ASTM: E 1913-04)

Приготвяне на хранителни изходни разтвори			Приготвяне на хранителен разтвор
Изходен разтвор	Химикал	Първоначално тегло на 1000 ml	ml на 5 l хранителен разтвор
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO ₃	8,08 g	
	Ca(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	18,88 g	
2	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	9,86 g	50
3	Вж. по-долу изходен разтвор 3.1		50
4	KH ₂ PO ₄	2,72 g	50
5	FeSO ₄ × 7 H ₂ O	0,278 g	50
	Na ₂ EDTA × 2 H ₂ O	0,372 g	

Изходните разтвори могат да се съхраняват в хладилник за 6 месеца (при температура от 5—10 °C). Само изходен разтвор № 5 има по-кратък срок на съхранение (два месеца).

Таблица 2

Приготвяне на изходен разтвор 3.1. за приготвяне на изходен разтвор 3

Химикал	Първоначално тегло g/100 ml
MnSO ₄ * 4 H ₂ O	0,223
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,115
H ₃ BO ₃	0,155
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,0125
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4 H ₂ O	0,0037

След приготвянето на изходен разтвор № 3.1 (таблица 2) този разтвор се подлага на дълбоко замразяване в около 11 ml-аликвотни части (при поне – 18°C). Дълбоко замразените порции имат срок на годност от пет години.

За приготвяне на изходен разтвор № 3, основен разтвор № 3.1 се размразява, 10 ml от него се поставят в мерителна колба от 1 l и се добавя ултрачиста вода до обозначението на колбата.

За да се получи модифицирана среда на Andrews, около 2 500 ml ултрачиста вода се поставят в мерителна колба с вместимост от 5 l. След добавяне на по 50 ml от всеки основен разтвор, 90 % от мерителната колба се запълват с ултрачиста вода и се коригира pH до 5,8.

▼ M7

След това се добавят 150 g разтворена захароза (3 % на 5 l); след това се добавя ултрачиста вода в мерителната колба до обозначението. Накрая хранителният разтвор се изсипва в колби Schott с вместимост от 1 l и се обработва в автоклав при 121°C в продължение на 20 минути.

Полученият по този начин хранителен разтвор може да се съхранява в хладилник при стерилни условия (при температура 5—10°C) за срок от три месеца.

Модифицирана среда на Andrews за изпитвания за токсичност без седименти

Десетократната концентрация на модифицираната среда на Andrews, която се изисква за получаване на изпитваните разтвори, се приготвя от петте изходни хранителни разтвора, посочени в таблици 1 и 2 по-горе, с добавка на 30 % захароза. За да се направи това се изсипват приблизително 100 ml ултрачиста вода в мерителна колба с вместимост от 1 l. След добавяне по 100 ml от всеки изходен разтвор, рН се коригира на 5,8. След това се добавя 30-процентен разтвор на захароза (300 g на 1 000 ml); след това мерителната колба се допълва до обозначението с ултрачиста вода.

Накрая хранителният разтвор се изсипва в колби Schott с вместимост от 0,5 l и се обработва в автоклав при 121°C в продължение на 20 минути.

Получената по този начин десетократна концентрация на модифицирания хранителен разтвор може да се съхранява в хладилник при стерилни условия (при температура 5—10°C) за срок от три месеца.

ПОДДЪРЖАНЕ НА ИЗХОДНАТА КУЛТУРА

В настоящото допълнение 3 се описва изходната култура на *Myriophyllum spicatum* L. ⁽¹⁾, подводно двуседелно растение от семейство Haloragaceae. Между юни и август над водната повърхност се показват неразличими розово-бели цветове. Растенията са вкоренени в земята чрез система от устойчиви коренища и се срещат в цялото северно полукълбо в еутрофни, но незамърсени и наситени на калций спокойни води с кален субстрат. *Myriophyllum spicatum* предпочита сладките води, но може да бъде открито и в бракични води.

За изходна култура без седимент в лабораторни условия са необходими стерилни растения. Стерилни растения са налични в екотоксикологичната лаборатория на германската Umweltbundesamt (Федерална агенция по околна среда на Германия).

Като алтернатива изпитваните организми могат да бъдат получени от нестерилни растения в съответствие с обозначението на ASTM E 1913-04. Вж. по-долу процедурата за култивиране на събрани на място растения от вида *Myriophyllum sibiricum*, взета от Ръководството на ASTM:

„Ако се започва със събирани на място нестерилни растения, събирането на филизи на *M. sibiricum* се извършва през есента. Филизите се поставят в 20-литров аквариум, съдържащ 5 cm стерилен седимент, покрит с кварцов пясък или например с Turface® и 18 l вода с квалификация „чист“. Аквариумът се аерира и в него се поддържа температура от 15 °C и скорост на преминаване от 200 до 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ в рамките на 16 часа дневно. Културата в аквариума може да се поддържа като резервен източник на растения, в случай че стерилните растителни култури бъдат унищожени поради механична повреда в камерата за растеж, поради замърсяване или по друга причина. Растенията, които се отглеждат в аквариума, не са стерилни и стерилните култури не могат да бъдат отглеждани в система за партидно култивиране. С цел стерилизация на културата растенията се отстраняват от аквариума и се изплакват с течаща дейонизирана вода в продължение на около 0,5 часа. При стерилни условия в шкаф с ламинарен въздушен поток растенията се дезинфектират за по-малко от 20 минути (до побеляване на по-голямата част от растителната тъкан, при което зелено остава само растящото връхче) в 3-процентен (w/v) разтвор на натриев хипохлорит, съдържащ 0,01 % подходящо повърхностно активно вещество. Дезинфектантът и растителният материал се разклащат. Сегменти с по няколко възела се прехвърлят в стерилни епруветки за култивиране, съдържащи 45 ml стерилизирана модифицирана среда на Andrews, и се затварят с плоски капачки за посевни епруветки. Във всяка камера за изпитване се поставя само един сегмент от растение. За да се гарантира, че посевният съд е добре затворен, се използва запечатващ филм за лабораторна употреба. След като стерилната култура е имплантирана, на всеки десет до дванадесет дни растителните сегменти с по няколко възела следва да се прехвърлят в нови камери за изпитване, съдържащи пресни течни хранителни среди. Както при култивирането в агарни посевки, растенията трябва да са стерилни и да останат стерилни за срок от осем седмици преди началото на изпитването.“

Тъй като модифицираната среда на Andrews съдържа захароза (която стимулира растежа на гъбички и бактерии), всички материали, разтвори и култивирането трябва да се приготвят в стерилни условия. Всички течности, както и оборудването, се стерилизират преди употреба. Стерилизация се извършва посредством обработка с горещ въздух (210°C) в продължение на 4 часа или чрез обработка в автоклав в продължение на 20 минути при температура от 121°C. В допълнение непосредствено преди употреба всички колби, блюда, чаши и т.н., както и останалото оборудване се подлагат на обработка с пламък върху стерилната работна маса.

Изходните култури могат да бъдат поддържани при намалено осветление и температура ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) за по-продължителни периоди, без да има нужда да бъдат повторно имплантирани. Средата за растеж на *Myriophyllum* следва да е същата като тази, използвана за изпитването, но за изходните култури може да се използва друга богата хранителна среда.

(1) Carl von Linné (* 23 май 1707 г. в Росхулт/Елмхулт; † 10 януари 1778 г. в Упсала).

▼ **M7**

Растителните сегменти се разпределят при пълно отсъствие на чужди организми в няколко 500-милилитрови Ерленмайерови или/и 2 000-милилитрови Фернбахови колби, всяка от които съдържа съответно около 450 или 1 000 ml модифицирана среда на Andrews. След това колбите се запущват с целулозни тапи, така че да не проникват други организми.

В допълнение е абсолютно необходимо оборудването на стерилния работен плот да се обработи с пламък непосредствено преди да бъде използвано. В зависимост от броя и размера си растенията трябва да бъдат прехвърляни в пресни хранителни среди приблизително на всеки три седмици.

За обновяването на културата могат да се използват както връхчета, така и сегменти от средата на стеблото. Броят и размерът на прехвърлените растения (или сегменти от растения) зависят от това колко растения са необходими. Можете например да прехвърлите пет сегмента от поник в една Фернбахова колба и три сегмента от поник в една Ерленмайерова колба, като дължината на всеки сегмент е 5 cm. Всички вкоренени, цъфнали, мъртви сегменти или сегменти с други видими изменения се отстраняват.

Фигура 1

Рязане на растения за изходна култура и предкултура след отглеждане в продължение на 3 седмици.



Култивирането на растения трябва да се извършва в 500-милилитрови Ерленмайерови и 2 000-милилитрови Фернбахови колби в инкубатор с охлаждане, при температура от 20 ± 2 °C при непрекъснато осветление в диапазон около $100\text{--}150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ или $6\,000\text{--}9\,000 \text{ Lux}$ (подавано от източник в камерата с цвятова температура „топла бяла светлина“).

Фигура 2

Култивиране на растения в инкубатор с охлаждане с източник на осветление в камерата.



Следва да се използват химически чисти (промита с киселина) и стерилни стъклени съдове за отглеждане, както и да се прилагат асептични техники за манипулиране. В случай на замърсяване на изходната култура, например с водорасли, гъби и/или бактерии, за обновяване на въпросната култура следва да се подготви нова култура или да се използва изходна култура от друга лаборатория.

▼ M7

Допълнение 4

ПОДДЪРЖАНЕ НА ПРЕКУЛТУРИТЕ И ПОДГОТОВКА НА ИЗПИТВАНИТЕ ОРГАНИЗМИ ЗА ИЗПИТВАНЕТО

За да се получи предкултура, поничите на изходната култура се нарязват на сегменти, като във всеки сегмент се съдържат по два прешлена; сегментите се поставят във Фернбахови колби, напълнени с модифицирана среда на Andrews (с 3-процентен разтвор на захароза). Всяка колба може да съдържа до 50 сегмента от поничите. Трябва обаче да се внимава сегментите да са жизнеспособни и да нямат корени и странични разклонения, нито техни пъпки (вж. фигура 1 в допълнение 3).

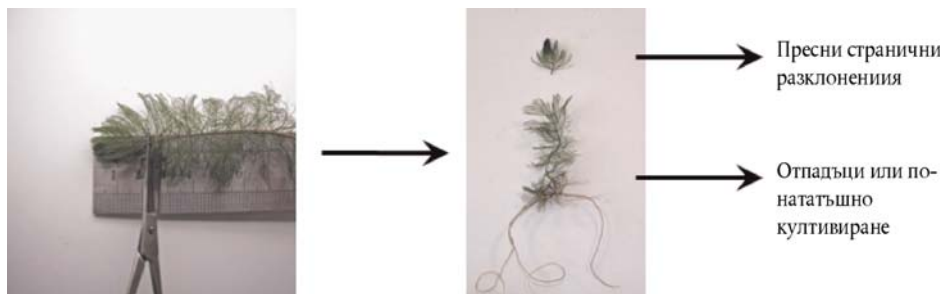
Организмите в предкултурите се култивират в стерилни условия в продължение на 14 до 21 дни в осигуряваща необходимите параметри на околната среда климатична камера при режим на светлина/тъмнина в съотношение 16/8 часа. Избраният светлинен интензитет е в диапазона $100\text{—}150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Температурата в съдовете за изпитване следва да бъде $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Тъй като модифицираната среда на Andrews съдържа захароза (която стимулира растежа на водорасли, гъбички и бактерии), разтворите на изпитвания химикал следва да се приготвят и култивирането да се извършва в стерилни условия. Всички течности, както и оборудването, се стерилизират преди употреба. Стерилизацията се извършва посредством обработка с горещ въздух (210°C) в продължение на 4 часа или чрез обработка в автоклав в продължение на 20 минути при температура от 121°C . В допълнение непосредствено преди употреба всички колби, блюда, чаши и т.н., както и останалото оборудване, се подлагат на обработка с пламък върху стерилната работна маса.

Поничите се отстраняват от колбите с предкултурите при пълно отсъствие на чужди организми, като се избира максимално хомогенен материал. За всяко изпитване се изискват най-малко 60 изпитвани организма (изпитване с осем концентрации на изпитвания химикал). За изпитването се вземат свежи странични разклонения от предкултури, скъсяват се до 2,5 cm от основата (измерването се извършва с линейка) и се прехвърлят в бехерова чаша, съдържаща стерилна модифицирана среда на Andrews. Тези пресни странични разклонения могат да бъдат използвани за целите на изпитване за токсичност без седименти при *Myriophyllum spicatum*.

Фигура 2

Рязане на растения от предкултурата за целите на изпитването за токсичност без седимент при *Myriophyllum spicatum*.



▼ M7**В.51. ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ В СИСТЕМА ВОДА-СЕДИМЕНТ ПРИ *MYRIOPHYLLUM SPICATUM***

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП 239 (2014 г.). Методи за изпитване има за плаващи едноседелни водни растения от род *Lemna* (1) и за различни видове водорасли (2). Тези методи рутинно се използват за генериране на данни за справяне с риска от изпитваните химикали, по-специално химикалите с хербицидна активност, за неприцелни видове водни растения. Въпреки това в някои случаи може да са необходими данни за допълнителни макрофитни видове. В актуално публикувано ръководство от семинара на Society of Environmental Toxicology and Chemistry (Дружество по екологична токсикология и химия — SETAC) за оценка на свързания с използването на пестициди риск за водните макрофити (AMRAP) се предлага данни за един вкоренен макрофитен вид да се изискват за изпитвани химикали, за които е известно, че *Lemna* и водораслите не проявяват чувствителност към начина им на действие, или ако съществува проблем с разпределението в седимента, водещ до експозиция чрез усвояване през корените (3). В съответствие с настоящото разбиране и опит *Myriophyllum* spp. са най-предпочитани при необходимост от получаване на данни за потопени вкоренени във вода двуседелни видове (4) (5) (6). Това изпитване не замества други изпитвания за токсичност във водна среда; то следва по-скоро да ги допълва с цел да се постигне по-пълна оценка на опасностите и рисковете за водните растения. Методът за изпитване в система вода-седимент на *Myriophyllum spicatum* допълва изпитването за токсичност без седимент при *Myriophyllum spicatum* (7).
2. В настоящия документ се описва метод за изпитване, който позволява оценка на въздействието на изпитвания химикал върху вкоренени водни растения от вида *Myriophyllum spicatum*, растящи в система вода-седимент. Методът за изпитване се основава отчасти на вече съществуващи методи (1) (2) (8) и взема предвид последните изследвания, свързани с оценката на риска за водните растения (3). Методът в система вода-седимент е валидиран чрез международно кръгово изпитване, проведено с растения от род *Myriophyllum*, отглеждани при статични условия, които са били изложени на въздействието на изпитвания химикал чрез водната колона (9). Системата за изпитване обаче лесно може да се адаптира, за да се позволи експозиция чрез използване на седимент с добавка или експозиция чрез водната фаза при сценарии с полустатично или импулсно дозиране, въпреки че тези сценарии не са преминали официално през кръгово изпитване. Освен това общият метод може да се използва за други вкоренени, потопени и плаващи над водата водни видове, включително и други видове от род *Myriophyllum* (например *Myriophyllum aquaticum*) и *Glyceria maxima* (10). За алтернативни видове може да се наложат изменения на условията, плана и продължителността на изпитването. По-специално е необходима допълнителна работа за определяне на подходящите за *Myriophyllum aquaticum* процедури. Тези възможности не са представени подробно в настоящия метод за изпитване, в който се описва стандартният подход за експозиция на *Myriophyllum spicatum* в статична система чрез водната фаза.
3. Този метод за изпитване се прилага за вещества, за които методът за изпитване е бил валидиран (вж. подробности в протокола от кръговото изпитване (9)), или за формулировки или известни смеси. Изпитване на растения от род *Myriophyllum* може да се проведе, за да се изпълни изискването от етап 1 за предоставяне на данни, налагащо се поради евентуално разпределение на изпитвания химикал в седиментния слой или заради проблеми, свързани с начина на действие/селективността. Лабораторно проведено изпитване на растения от род *Myriophyllum* може да се изисква също така като част от стратегия за изпитване на по-следващ етап с цел да се предложи решение на проблемите, свързани с риска за водните растения. Конкретната причина за провеждане на изпитването определя и пътя на експозицията (т.е. чрез вода или седимент). Преди използването на настоящия метод за изпитване на смес с регулаторна цел следва да се обмисли дали той може да предостави подходящи за целта резултати и ако да — защо. Подобни съображения не са необходими, когато има регулаторно изискване за изпитване на сместа.

▼ M7

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

4. Изпитването е предназначено да се оценят свързаните с химикала въздействия върху вегетативния растеж на растения от род *Myriophyllum*, растящи в стандартизирана среда (вода, седимент и хранителни елементи). За тази цел връхчетата на поничите на здрави нецъфнали растения се засаждат в стандартизиран изкуствен седимент, обогатен с допълнителни хранителни вещества, за да се гарантира подходящ растеж на растенията, след което се поддържат в среда Smart и Barko (допълнение 1). След период на имплантация, който дава възможност за образуване на корени, растенията се подлагат на серия от изпитвани концентрации, които се добавят във водната колона. Като алтернатива експозиция през седимента може да бъде стимулирана чрез добавяне на изпитвания химикал към изкуствения седимент и пресаждане на растенията в този седимент с добавка на химикал. И в двата случая след това растенията се поддържат в контролирани условия на околната среда в продължение на 14 дни. Въздействието върху растежа се определя чрез количествени оценки на дължината на поника, свежото тегло и сухото тегло, както и чрез качествени наблюдения на симптоми, като например хлороза, некроза или деформации при растежа.
5. С цел количествено определяне на свързани с химикала въздействия растежът в изпитваните разтвори се сравнява с растежа в контролните растения и концентрацията, предизвикваща инхибиране на растежа до определените $x\%$, се определя и изразява като EC_x ; „ x “ може да бъде всяка стойност в зависимост от нормативните изисквания, например EC_{10} , EC_{20} и EC_{50} . Следва да се отбележи, че оценките на EC_{10} и EC_{20} са надеждни и подходящи само за тестове, при които коефициентите на вариация в контролните растения падат под оценяваното равнище на въздействие, т.е. за устойчива оценка на EC_{20} коефициентите на вариация следва да бъдат $< 20\%$.
6. Следва да се определи както средната специфична скорост на растежа (прогнозирана въз основа на оценки на дължината на поника, свежото тегло на поника и сухото тегло на поника) и добива (прогнозиран въз основа на увеличението на дължината на поника, свежото тегло на поника и сухото тегло на поника) от нетретирани и третирани растения. Специфичната скорост на растежа (r) и добива (y) впоследствие се използват за определяне съответно на $E_r C_x$ (напр. $E_r C_{10}$, $E_r C_{20}$, $E_r C_{50}$) и $E_y C_x$ (напр. $E_y C_{10}$, $E_y C_{20}$, $E_y C_{50}$).
7. Ако се изисква, най-ниската концентрация, при която се наблюдава въздействие (LOEC), и концентрацията без наблюдавано въздействие (NOEC) могат да бъдат определени статистически от оценките за средната специфична скорост на растеж и за добива.

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНИЯ ХИМИКАЛ

8. Следва да е наличен метод за анализ с достатъчна чувствителност за количествено определяне на химикалите в средата на изпитване.
9. Информацията относно изпитвания химикал, която може да бъде полезна за установяване на условията на изпитването, включва структурната формула, състава, в случай на вещество с повече съставки, UVCB, смеси или формулировки, чистота, разтворимост във вода, стабилност във вода и на светлина, константата на киселинна дисоциация (pK_a), коефициент на разпределение октанол-вода (K_{ow}), ако има данни — K_d за седимента, парно налягане и биоразградимост. Разтворимостта във вода и парното налягане може да се използват за изчисляване на константата по закона на Хенри, която ще покаже дали се очакват значителни загуби на изпитвания химикал през периода на изпитването. Ако съществува вероятност за загуба на изпитвани химикали, те следва да бъдат количествено определени и последващите мерки за контрол на подобни загуби следва да бъдат документирани. Когато информацията за разтворимостта и стабилността на изпитвания(ите) химикал(и) е несигурна, се препоръчва тези свойства да бъдат оценени в условията на изпитване, т.е., среда на растеж, температура, режим на осветеност, които ще бъдат използвани при изпитването. *Забележка:* когато се изпитват зависими от светлина пероксидащи хербициди, използваното лабораторно осветление следва да съдържа еквивалентно наличие на слънчева ултравиолетова светлина, която се среща при естествената слънчева светлина.

▼ **M7**

10. рН следва да се измерва и коригира в средата за изпитване в зависимост от случая. Контролът на рН в изпитваната среда е особено важен, например при изпитване на метали или химикали, които са неустойчиви на хидролиза. Допълнителни насоки за изпитване на химикали, чиито физични и химични свойства затрудняват тяхното изпитване, са дадени в ръководство на ОИСР с насоки (11).

ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

11. За да бъдат валидни резултатите от изпитването, средната обща дължина на поника и средното общо свежо тегло на поника при контролните растения трябва поне да се удвои по време на етапа на експозицията в рамките на изпитването. В допълнение контролните растения трябва да не показват видими симптоми на хлороза, нито видими признаци на замърсяване с други организми като водорасли и/или бактериален филм по растенията, по повърхността на седимента и в средата за изпитване.
12. Средната стойност на коефициента на вариация на добива, основан на измервания на свежото тегло на поника (т.е. от началото до края на изпитването), в контролните култури не надвишава 35 % между повторенията.

РЕФЕРЕНТЕН ХИМИКАЛ

13. Референтните химикали, като 3,5-дихлорофенола, които се използват в кръговото изпитване (9), следва да се изпитват периодично с цел проверка на процедурата на изпитване във времето. Данните от кръговото изпитване показват, че средната стойност на EC_{50} за 3,5-дихлорофенола при различните зависими променливи е между 4,7 и 6,1 mg/l (вж. протокола от кръговото изпитване за подробности относно доверителния интервал за тези стойности). Желателно е референтният химикал да се изпитва най-малко два пъти годишно или, когато изпитването се извършва по-рядко, да се извършва едновременно с окончателните изпитвания за токсичност. Насока за очакваните стойности на EC_{50} за 3,5-дихлорофенола е предоставена в Статистическия доклад от международното кръгово изпитване (9).

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА**Изпитвателна апаратура**

14. Изпитването следва да се проведе при контролирани условия на околната среда, т.е. в климатична камера, помещение или лаборатория с контролируеми продължителност на деня, осветление и температура (вж. раздел „Условия на изпитване“, точки 56—58). Изходните култури следва да бъдат държани отделно от съдовете за изпитване.
15. За изследването следва да се използват стъклени съдове като аквариуми или бехерови чаши; обикновено се използват 2-литрови бехерови чаши (с височина около 24 cm и диаметър 11 cm). Други (т.е. по-големи) съдове обаче може също да са подходящи, при условие че позволяват достатъчна дълбочина на водата, при която растенията могат да растат без ограничения и да останат потопени за целия срок на изпитването.
16. Саксии от пластмаса или стъкло (с диаметър около 9 cm, височина от 8 cm и вместимост от 500 ml) могат да се използват като контейнери с цел поставяне на растенията в седимента. Като алтернатива използването на бехерови чаши е възможно и се предпочита в някои случаи (например при изпитване на хидрофобни химикали или химикали с висок коефициент на разпределение октанол-вода (K_{ow})).
17. Изборът на размер на саксията/бехеровата чаша трябва да бъде съобразен с избора на съдове за изпитването и с предпочитания план на изпитването (вж. по-долу). Ако използвате план на изпитване А (един поник на саксия и три саксии на съд), може да са необходими по-малки саксии или по-големи съдове. Ако използвате план на изпитване Б (три поника на саксия и една саксия на съд), посочените размери на саксията и съда следва да са подходящи. Във всички случаи водата следва да бъде на минимум 12 cm над горния слой на седимента и съотношението между площта/обема на седимента и площта/обема на водата следва да бъде записано.

▼ M7

Изпитван организъм

18. Общите подходи, описани в настоящия метод на изпитване, могат да бъдат използвани за изпитване на редица водни растителни видове. Изложените в настоящия метод условия на изпитване обаче са пригодени за изпитване на вида *Myriophyllum spicatum*. Този вид принадлежи към семейството двусемеделни растения Haloragaceae.
19. *Myriophyllum spicatum* (класовиден многолистник) е потопен вкоренен във водата вид, който толерира широк диапазон от условия и се среща както в неподвижни води, така и течащи водни басейни. *M. spicatum* е многогодишно растение, което през зимата умира до равнището на корените. Растенията обикновено цъфтят и образуват семена свободно, въпреки че вегетативното размножаване чрез аксиларни пъпки или стволони части, които се отделят по естествен път или вследствие на смущение, често е основен метод за колонизация.

Култивиране на изпитваните организми

20. Растенията могат да бъдат получени от естествени популации или чрез доставчици на водни растения. И в двата случая източникът на растенията следва да се документира и да се направи проверка на идентичността на видовете. Необходимо е специално внимание, за да се гарантира, че при събирането на *Myriophyllum spicatum* на място е взет правилният вид, особено в региони, където растението може да се кръстоса с други видове от същия род. В случай на съмнение се препоръчва използването на проверени лабораторни култури от известни източници. Растения, които са били изложени на химични замърсители или са събрани от места, за които се знае, че са замърсени, следва да не се използват за целите на настоящото изпитване.
21. В регионите, в които растенията от вида *M. spicatum* не са достъпни през зимните месеци, може да се наложи дългосрочно поддържане на изходни култури в оранжерийни или лабораторни условия. Изходните култури следва да се поддържат при условия, подобни на условията на изпитване, въпреки че облъчването и температурата може да се намалат, за да се намали честотата на поддържане на културата (например когато за известен период от време няма предвидени изпитвания на *Myriophyllum*). Препоръчва се за изпитването да се използват големи аквариуми и саксии, за да се предостави пространство за пролиферация. Съставът на седимента и водата следва да е същият като този, който се използва за целите на изпитването, въпреки че могат да се възприемат алтернативни методи за фертилизация на седимента (например използване на търговски формулировки на торове с бавно освобождаване).
22. Изходните растения не следва да показват видими признаци на замърсяване с други организми, включително охлюви, нишковидни водорасли, гъби и насекоми, например яйца или ларви на *Paraponyx stratiotata* и ларви или полово зрели индивиди от семейство хоботници (*Eubrychius velutus*). Може да се наложи изплакване на растителния материал в прясна вода с цел премахване на видимо замърсяване. В допълнение следва да се положат усилия да се намали развитието на едноклетъчни водорасли и бактериалното замърсяване, въпреки че не е необходима пълна стерилност на растителния материал. Изходните култури следва да се наблюдават и пресаждат, както е необходимо, така че да се избегне замърсяването с водорасли и бактерии. Аерирането на изходните култури може да бъде от полза при проблеми със замърсяването с водорасли и бактерии.
23. Във всички случаи растенията се култивират/аклиматизират в условия, които са подобни, но не непременно идентични на използваните за целите на изпитването в рамките на подходящ период от време (т.е. > 2 седмици), преди да бъдат използвани в изпитването.
24. Цъфтящите изходни култури не следва да се използват за изпитване, тъй като скоростта на вегетативния растеж обикновено намалява по време на цъфтежа и след него.

▼ **M7****Седимент**

25. За използване в настоящото изпитване се препоръчва следният формулиран седимент, приготвен въз основа на изкуствения седимент, използван в метод за изпитване В.28 от настоящото допълнение (8). Седиментът се приготвя, както е описано в МИ В.28, с изключение на добавянето на хранителни вещества, описано по-долу:
- а) 4–5 % торф (сухо тегло, съответно $2 \pm 0,5$ % органичен въглерод) възможно най-близо до рН от 5,5–6,0; важно е да се използва торф в прахообразна форма, фино смлян (за предпочитане с размер на частиците <1 mm) и изсушен само на въздух.
 - б) 20 % каолин (сухо тегло) (за предпочитане съдържанието на каолинит да е повече от 30 %);
 - в) 75–76 % кварцов пясък (сухо тегло) (следва да преобладава финият пясък с размер на частиците между 50 и 200 μm);
 - г) Добавя се водна хранителна среда, така че окончателният седимент да съдържа 200 mg/kg сух седимент на амониев хлорид и натриев фосфат и съдържанието на влага в крайната смес да е в диапазона 30–50 %.
 - д) Добавя се химически чист калциев карбонат (CaCO_3), за да се коригира рН на крайната смес на седимента до $7,0 \pm 0,5$.
26. Източникът на торф, каолинова глина и пясък следва да е известен и да бъде документиран. Ако произходът е неизвестен или поражда безпокойство, съответните компоненти следва да бъдат проверени за наличие на замърсяване с химикали (например тежки метали, органични съединения, органофосфорни съединения).
27. Сухите съставки на седимента следва да бъдат хомогенно смесени преди да се смеси добре водният хранителен разтвор със седимента. Влажният седимент следва да се приготви най-малко два дни преди употреба, за да може торфът изцяло да се напои и да се попречи на хидрофобните торфени частици да останат на повърхността, когато седиментът бъде злят със средата; преди употреба влажният седимент може да се съхранява на тъмно.
28. За целите на изпитването утайката се прехвърля в контейнери с подходящ размер, като например саксии с диаметър, позволяващ поставянето им в стъклените съдове (повърхността на седимента следва да покрива приблизително 70 % или повече от повърхността на съда). Когато по дъното на контейнера има дупки, може да се постави филтърна хартия, за да може седиментът да се задържи в контейнера. Саксиите се пълнят със седимента, като повърхността на седимента се заравнява преди да се бъде покрита с тънък слой (~ 2 до 3 mm) инертни материали, като например пясък, фин градинарски пясък (или натрошени корали), които да задържат седимента на място.

Среда за изпитване

29. За култивиране и изпитване на растения от вида *Myriophyllum spicatum* се препоръчва използването на среда Smart и Barko (12). Приготвянето на тази среда е описано в допълнение 1. Стойностите на рН на средата (водната фаза) в началото на изпитването следва да бъдат между 7,5 и 8,0 за оптималния растеж на растенията.

План на опита

30. Изпитването следва да включва минимум шест съда за изпитване с повторения за нетретирани контроли и минимум четири съда за изпитване с повторения за всяко от минимум пет равнища на концентрация.
31. Ако не се изисква определяне на NOEC, планът за изпитването може да бъде променен, като се увеличи броят на концентрациите и се намали броят на повторенията за всяка от концентрациите.

▼ **M7**

32. Всеки съд за изпитване представлява повторение, съдържащо три поника. Съществуват два варианта за отглеждане на три поника във всеки съд за изпитване:
- План на изпитване А: един поник на саксия и три саксии на съд.
 - План на изпитване Б: три поника на саксия и една саксия на съд.
 - Като алтернатива може да се приеме план на изпитване, включващ една саксия на съд за изпитване, при условие че повторенията бъдат коригирани според необходимото с цел постигане на необходимите критерии за валидност.
33. Отделните съдове за изпитване следва да бъдат разпределени на случаен принцип между третираните групи. За минимизиране на влиянието на пространствените различия в интензитета на светлината и температурата се изисква схема за разполагане на случаен принцип на съдовете за изпитване в зоната за изпитване.

Концентрации на изпитвания химикал и контролни групи

34. Концентрациите по принцип трябва да следват геометрична прогресия; кратността на разделяне между изпитваните концентрации не следва да надхвърля 3,2. Предварителното познаване на токсичността на изпитвания химикал, например от изпитване за определяне на обхвата, ще помогне при избирането на подходящи изпитвани концентрации.
35. За определяне на EC_x изпитваните концентрации следва да обграждат EC_x , за да се гарантира подходяща доверителна вероятност. Например, ако се оценява EC_{50} , най-високата изпитвана концентрация следва да е по-висока от стойността на EC_{50} . Ако стойността на EC_{50} попада извън обхвата на изпитваните концентрации, свързаните с нея доверителни интервали ще бъдат големи и правилната оценка за статистическата съгласуваност на модела може да не е възможна. Използването на повече изпитвани концентрации ще подобри доверителния интервал за получената стойност на EC_x .
36. За да се определи LOEC/NOEC (крайна точка по избор), най-ниската концентрация на изпитването следва да бъде достатъчно ниска, така че растежът да не се различава съществено от растежа при контролните растения. В допълнение най-високата изпитвана концентрация следва да е достатъчно висока, така че растежът да бъде значително по-нисък от този в контролната проба. Използването на повече повторения ще увеличи статистическата мощност на модела, основан на липса на въздействие-концентрация и ANOVA.

Гранично изпитване

37. В случаи, когато изпитване за определяне на обхвата показва, че изпитваният химикал няма неблагоприятно въздействие при концентрации до 100 mg/l или до неговата граница на разтворимост в изпитваната среда или, в случай на формулировки, до неговата граница на диспергиране, може да бъде осъществено гранично изпитване за сравняване на отклика в контролна група и в една от третираните групи — 100 mg/l или концентрация, равна на границата на разтворимост, или 1 000 mg/kg сух седимент. Това изпитване трябва да следва основните принципи на стандартно изпитване на зависимостта доза-отклик, с изключение на това, че се препоръчва увеличение на минималния брой повторения на шест съда за изпитване на контрола и концентрация. Растежът в контролната и третираната група може да се анализира чрез използване на статистически тест за сравняване на средните стойности, например t-тест на Стюдънт.

Разтвори за изпитване

38. Разтворите за изпитване обикновено се приготвят с разреждане на изходен разтвор, получен чрез разтваряне или диспергиране на изпитвания химикал в среда Smart и Barko, като се използва деминерализирана (т.е. дестилирана или дейонизирана) вода (вж. допълнение 1).

▼ **M7**

39. Най-високата концентрация на изпитване обикновено не следва да надвишава разтворимостта във вода на изпитвания химикал или, в случай на формулировки, диспергируемостта при условията на изпитване.
40. За изпитвани химикали с малка водоразтворимост може да е необходимо да се приготви концентриран изходен разтвор или химикалът да се диспергира, като се използва органичен разтворител или диспергиращо средство, за да се улесни добавянето на точни количества от изпитвания химикал към средата на изпитване и да се подпомогне неговото диспергиране и разтваряне. Следва да се положат всички усилия, за да се избегне използването на такива разтворители или диспергиращи средства. Не следва да има фитотоксичност в резултат на използването на спомагателни разтворители или диспергиращи средства. Например обичайно използваните разтворители, които не предизвикват фитотоксичност при концентрации до 100 µl/l, включват ацетон и диметилформамид. Ако се използва разтворител или диспергиращо средство, следва да бъде протоколирана неговата крайна концентрация и тя да се поддържа на минимално ниво (≤ 100 µl/l). При такива обстоятелства всички третираня и контроли (на разтворител) следва да съдържат еднаква концентрация на разтворителя или диспергиращото средство. Повторенията с нетретираня контроли, които не съдържат разтворител или диспергиращо средство, също са включени в плана на изпитването. Допълнителни насоки относно използването на диспергиращи средства са дадени в ръководството на ОИСП с насоки (11).

ПРОЦЕДУРА НА ИЗПИТВАНЕ

41. Процедурата на изпитване е различна в зависимост от пътя на прилагане на изпитвания химикал (т.е. чрез водната фаза или фазата на седимента). Следва да се вземе предвид вероятното поведение на изпитвания химикал в система вода-седимент, за да се направи информиран избор по отношение на режима на експозиция, който да бъде използван в изпитването (т.е. статичен или статичен с обновяване, вода с добавка или седимент с добавка). Изпитвания с използване на седимент с добавка могат да бъдат предпочитани в някои случаи за химикали, за които се предвижда значимо разпределение в седимента.

Фаза на имплантация

42. Здравото връхче на поника, т.е. без странични поници, се отрязва от култивираното растение, като се цели дължина на поника 6 cm (± 1 cm). При план на изпитване А (един поник на саксия и три саксии на съд) във всяка саксия се засажда по едно връхче на поник. При план на изпитване Б (три поника на саксия и една саксия на съд) във всяка саксия, съдържаща седимент, се засаждат четири до пет поника.
43. И в двата случая се засаждат допълнителни саксии, за да се даде възможност за избор на еднородни растения в началото на изпитването, както и за да се осигурят резервни растения, които да се използват за проверка на растежа на корените непосредствено преди третирането, и резервни растения, които да бъдат събирани за измервания на биомасата и дължината на пониците в ден 0.
44. Пониците се поставят така, че около три сантиметра от тях, обхващащи най-малко два възела, да остават под повърхността на седимента.
45. След това саксии се пренасят в съд за изпитване при същите условия на околната среда като тези по време на етапа на експозиция, и се съхраняват в продължение на седем дни в среда Smart и Barko, за да се предизвика развитие на корените.
46. След изтичане на този срок няколко растения от резервните саксии следва да бъдат извадени за проверка на растежа на корените. Ако не се наблюдава растеж на корените (т.е. няма видими връхчета на корени), етапът на имплантация следва да се удължи, докато растежът на корените стане видим. Тази стъпка се препоръчва, за да се гарантира, че при започване на изпитването растенията са във фаза на активен растеж.

▼ M7**Подбор на еднакъв растителен материал**

47. При план на изпитване А (един поник на саксия и три саксии на съд) преди началото на изпитването се прави подбор на еднородни саксии. При план на изпитване Б (три поника на саксия и една саксия на съд) допълнителните растения се отстраняват, за да останат три еднакви по размер и външен вид растения.

Експозиция чрез водната фаза

48. Избраните еднородни саксии се поставят в съдовете за изпитване в съответствие с изискванията на плана на проучването. След това в съдовете за изпитване се добавя среда Smart и Barko. Следва да се внимава, за да се избегне въздействие върху седимента. За тази цел средата може да се добави с помощта на фуния или пластмасов диск, с който да се покрие седиментът, докато средата се излива в съдовете, при условие че дискът бъде отстранен веднага след това. Като алтернатива саксиите с растенията могат да се поставят в съдовете за изпитване след добавянето на средата. И в двата случая в началото на експозицията може да се използва прясна среда, ако е необходимо да се сведе до минимум потенциалното натрупване на водорасли и бактерии, или да се позволи приготвянето на единични партиди разтвор за изпитване за повторенията.
49. Дължината на поника над седимента се измерва преди или след добавянето на средата.
50. Съответните количества от изпитвания химикал могат да се добавят в средата за изпитване преди тя да бъде добавена в съдовете за изпитване. Като алтернатива изпитваният химикал може да бъде въведен в средата, след като тя е била добавена в съдовете за изпитване. В този случай следва да се внимава, за да се гарантира, че изпитваният химикал е разпределен хомогенно в системата за изпитване, без да се предизвиква въздействие върху седимента.
51. Във всички случаи външният вид на средата за изпитване (например бистра, мътна и т.н.) се записва в началото на изпитването.

Експозиция чрез седимент

52. Седиментите с добавка с избрана концентрация се приготвят чрез добавяне на разтвор на изпитвания химикал директно към пресния седимент. Изходен разтвор на изпитвания химикал, разтворен в дейонизирана вода, се смесва с формулирания седимент с помощта на валцова мелница, смесител за фураж или смесване с ръка. Ако е малко разтворим във вода, изпитваният химикал може да бъде разтворен във възможно най-малък обем подходящ органичен разтворител (например хексан, ацетон или хлороформ). След това този разтвор се смесва с приблизително 10 g фин кварцов пясък за всеки съд за изпитване. Разтворителят се оставя да се изпари и след това пясъкът се смесва с подходящо количество седимент във всяка бехерова чаша. За разтваряне, диспергиране или емулгиране на изпитвания химикал могат да се използват само средства, които лесно се изпаряват. Обемът/теглото на добавения в изпитвания химикал пясък следва да се вземе предвид при окончателната подготовка на седимента (т.е. седиментът следва да се приготви с по-малко пясък). Следва да се внимава изпитваният химикал, добавен към седимента, да бъде старателно и равномерно разпределен в седимента.
53. Седиментът с добавка се поставя в саксиите (както е описано по-горе). Растенията, избрани заради своята еднородност и подходящата си коренова система, се отстраняват от саксиите, използвани в етапа на имплантация, и се пресаждат в седимента с добавка, както е описано по-горе.
54. Саксиите се поставят в съдовете за изпитване в съответствие с изискванията на плана на проучването. След това внимателно (т.е. с помощта на фуния) се добавя средата Smart и Barko с цел да се избегне въздействие върху седимента. Дължината на поника над седимента се измерва преди или след добавянето на средата.

▼ M7**Поддържане на водните равнища за периода на изпитването**

55. Крайният обем на водата трябва да бъде записан и равнището на водата се маркира на всеки съд. Ако по време на изпитването повече от 10 % от водата се испари, равнището на водата следва да се коригира, като се добави дестилирана вода. Ако е необходимо, бехеровите чаши може да бъдат свободно покрити с прозрачно покритие, например прозрачни пластмасови капачки, с цел да се минимизира изпарението и замърсяването със спори на водорасли.

Условия на изпитване

56. Използва се топло и/или студено бяло флуоресцентно осветление за осигуряване на светлинно облъчване в диапазон около $140 (\pm 20) \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, когато се измерва като фотосинтетично активно излъчване (400—700 nm) на повърхността на водата, и при съотношение между светлина и тъмнина от 16:8 часа. Разликите с избраното светлинно облъчване в зоната на изпитване следва да не надвишават диапазон от $\pm 15\%$.
57. Температурата в съдовете за изпитване е $20 \pm 2^\circ\text{C}$.
58. Стойността на pH на контролната среда не следва да се повишава с повече от 1,5 единици по време на изпитването. Въпреки това, отклонение с повече от 1,5 единици не прави изпитването невалидно, при условие че може да се покаже, че посочените преди това критерии за валидност са изпълнени.

Продължителност на изпитването

59. Периодът на експозиция е 14 дни.

Измервания и аналитични определяния

60. След етапа на имплантация и непосредствено преди третирането (т.е. в ден 0) резервни растения от пет произволно избрани саксии за плана с три растения на саксия, или 15 саксии за плана с едно растение в саксия, се събират за оценка на дължината на поника и измерване на свежото и сухото тегло, както е описано по-долу.
61. За прехвърлени в етапа на експозиция растения се правят следните оценки, както е показано в таблица 1:
- Оценките на дължината на основния поник, броя на страничните поничи и дължината на страничните поничи се записват като минимум в края на периода на експозиция (например в ден 14).
 - Визуалните оценки на здравословното състояние на растенията се записват поне на три пъти по време на периода на експозиция (например в ден 0, 7 и 14).
 - Оценката на свежото и сухото тегло на поника се прави в края на изпитването (т.е. в ден 14).
62. Дължината на поника се определя с помощта на линейка. Ако са налице странични поничи, техният брой и дължина следва също да бъдат измерени.
63. Визуалните оценки на здравословното състояние на растенията се правят, като се записва външният вид на растенията и общото състояние на средата за изпитване. Наблюденията, които трябва да бъдат отбелязани, включват:
- Некроза, хлороза или друга промяна на цвета, например прекомерно зачервяване в сравнение с контролните растения.
 - Развитие на замърсяване с бактерии или водорасли;
 - Аномалии на растежа, като например спиране на растежа, промяна на междувъзловото разстояние, изкривяване на поничите/листата, пролиферация на странични поничи, загуба на листа, загуба на тургор и фрагментация на стъблото.

▼ M7

- Визуалните оценки на здравословното състояние на корените се правят в края на изпитването, като корените внимателно се отмиват от седимента, за да се позволи наблюдение на кореновата система. По-долу е показано предложение за оценъчна скала, позволяваща сравнение с контролните растения:
- 1) отсъствие на корени
 - 2) няколко корена
 - 3) умерено развитие на корените
 - 4) много добро развитие на корените, подобно на това в контролите
64. Оценката на свежото тегло се прави в началото и в края на изпитването, като поникът се изрязва на равнището на седимента и след това се попива водата преди претегляне. Следва внимателно да се отстранят седиментните частици, които може да са останали в основата на поника. След това взетият от поника материал се поставя в сушилня при температура от около 60°C и се суши до постоянно тегло преди повторното претегляне и записване на сухото тегло.
65. В таблица 1 е представено обобщение на минималните биологични оценки, които трябва да бъдат направени по време на изпитването.

Таблица 1

График на оценка

Ден след третирането (ДСТ)	<i>Myriophyllum spicatum</i>			
	Дължина на пониците, дължина и брой на страничните поничи	Визуална оценка на пониците	Свежо и сухо тегло на пониците Визуална оценка на корените	pH O ₂
0	A	A	A	A
4	—	-	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: показва, че в тези случаи се изисква оценка

—: показва, че не се изискват измервания

Честота на измерванията и аналитичните определяния

66. Температурата на средата в допълнителен съд, който се държи при същите условия във вегетационната камера, инкубатора или помещението, следва да се записва най-малко веднъж дневно (или постоянно чрез устройство за запис на данни).
67. pH и концентрацията на разтворен кислород в средата за изпитване следва да се проверяват в началото на изпитването, най-малко един път в хода на изследването и в края на изследването във всички съдове с повторения. Във всеки от тези случаи измерванията следва да се правят по едно и също време на деня. Ако при приготвянето на повторенията за всяка изпитвана концентрация се използва общ разтвор, допустимо е да се извърши едно измерване за всеки общ разтвор в ден 0.
68. Облъчването следва да се измерва в климатичната камера, инкубатор или помещение в точки, разположени на същото равнище като повърхността на водата. Измерванията следва да се извършват най-малко веднъж в началото на изпитването или по време на изпитването. Методът за детектиране и измерване на светлината, особено видът на сензора, ще оказват влияние върху измерваната стойност. Сферичните

▼ M7

сензори (които реагират на светлина, излъчвана от всички ъгли над и под равнината на измерване) и „косинусовите“ сензори (които реагират на светлината, излъчвана от всички ъгли над равнината на измерване), са за предпочитане пред еднопосочните сензори и ще отчитат по-високи показания за описания тук вид многоточков източник на светлина.

Аналитични измервания на изпитвания химикал

69. Правилното прилагане на изпитвания химикал следва да бъде подкрепено с аналитични измервания на концентрациите на изпитвания химикал.
70. За целите на анализа на изпитвания химикал водните проби следва да се вземат малко след началото на изпитването (т.е. за стабилните химикали в деня на прилагането или един час след прилагането — за химикали, които не са стабилни) и в края на изпитването за всички изпитвани концентрации.
71. Концентрациите в седимента и във водата между частиците на седимента следва да се определят в началото и в края на изпитването, поне за най-високата изпитвана концентрация, освен в случаите, когато за изпитваните химикали се знае, че са стабилни във вода (> 80 % от номиналната стойност). Измерванията в седимента и във водата между частиците на седимента може да не се окажат необходими, ако разпределението на изпитвания химикал между водата и седимента е ясно определено с изследване вода/седимент при сходни условия (напр. съотношение на седимента към водата, метод на прилагане, тип седимент).
72. Вземането на проби от седимента в началото на изпитването вероятно предизвиква смущения в системата за изпитване. Следователно може да са необходими допълнителни третиращи съдове за изпитване с цел улесняване на аналитичните измервания в началото и в края на изпитването. Също така, когато се прецени, че е необходимо да се извършат междинни измервания, т.е. в ден 7, и анализите изискват големи седиментни проби, които не могат да бъдат лесно отстранени от системата за изпитване, аналитичните определяния следва да се извършват с помощта на допълнителни съдове за изпитване, които са третиращи по същия начин като тези, използвани за биологичните оценки.
73. Препоръчва се центрофугиране на примерно 10 000 g при температура от 4°C в продължение на 30 минути с цел изолиране на интерстициалната вода. Ако обаче се докаже, че изпитваният химикал не се абсорбира от филтрите, филтруването може също да е приемливо. В някои случаи може да не е възможно да се анализират концентрациите във водата между частиците на седимента, ако пробата е с много малък размер.
74. В полустатични изпитвания (т.е. експозиция чрез водната фаза), при които не се очаква концентрацията на съответния изпитван химикал/съответните изпитвани химикали да остане в рамките на 20 % от номиналната концентрация в хода на изпитването без обновяване на изпитваните разтвори, при всяко обновяване следва да се вземат проби от използвани и прясно приготвени разтвори за изпитване за целите на анализа на изпитваната концентрация на химикала.
75. В случаи, при които измерената начална концентрация на изпитвания химикал не е в рамките на 20 % от номиналната стойност, но за които може да се предоставят достатъчно доказателства, показващи че началните концентрации са повторяеми и стабилни (т.е. в диапазона 80—120 % от началната концентрация), химичните определения могат да се извършват само за най-високата и най-ниската изпитвана концентрация.
76. Във всички случаи е необходимо определянето на концентрациите на изпитвания химикал да бъде извършвано само в един съд с повторение при всяка една изпитвана концентрация. Като алтернатива изпитваните разтвори на всички повторения за всяка концентрация могат да бъдат обединени за анализ.
77. Ако има доказателство, че концентрацията на изпитвания химикал е била поддържана в рамките на 20 % от номиналната или измерената първоначална концентрация през цялото време на изпитването, тогава анализът на резултатите и последващото извеждане на крайните точки могат да бъдат базирани на номиналните или измерените първоначални стойности.

▼ **M7**

78. В тези случаи концентрациите с определено въздействие следва да се основават на номиналната концентрация или на измерените водни концентрации в началото на изпитването.
79. Въпреки това, ако има доказателства, че концентрацията е намаляла (т.е. не се поддържа в рамките на 20 % от номиналната или измерената първоначална концентрация в третираното отделение) в хода на измерването, анализът на резултатите следва да се основава на средната геометрична концентрация по време на експозицията или на модели, описващи намаляването на концентрацията на изпитвания химикал в третираното отделение (11).

ОЦЕНКА НА ДАННИТЕ

80. В случаите, когато се изисква използване на разтворител/диспергиращо средство, данните от контролите на разтворител и нетретираните контроли могат да се обединят за целите на статистическите анализи, при условие че между отклиците в контролите на разтворител и в нетретираните контроли няма статистически значими разлики.

Зависими променливи

81. Целта на изпитването е да се определят въздействията на изпитвания химикал върху вегетативния растеж на изпитваните видове чрез използване на две зависими променливи — средна специфична скорост на растежа и добив, както следва:

Средна специфична скорост на растеж

82. Тази зависима променлива се основава на промените в логаритмите на общата дължина на поника, общото свежо тегло на поника и общото сухо тегло на поника с течение на времето в контролите и във всяка от третираните групи. Тази променлива се изчислява за всяко повторение на всяка контрола и третирана група. Средната дължина и средното тегло на трите растения във всеки съд за изпитване (повторение) и, впоследствие, скоростта на растеж за всяко повторение, следва да се изчисляват по следната формула:

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

където:

μ_{i-j} : средна специфична скорост на растеж за времето от i до j

N_i : измервана променлива в съда за изпитване или в контролния съд в момента от време i

N_j : измервана променлива в съда за изпитване или в контролния съд в момента от време j

t : времеви интервал от i до j

83. Въз основа на отклиците при повторенията следва да се изчислява средна стойност за скоростта на растеж заедно с оценки на дисперсията за всяка третирана и контролна група.
84. Средната специфична скорост на растеж следва да се изчисли за целия период на изпитване (времето „ i “ в горната формула е началото на изпитването, а времето „ j “ е краят на изпитването). За всяка изпитвана концентрация и контрола се изчислява средната стойност на скоростта за растеж заедно с оценките на дисперсията.

▼ **M7**

85. Процентът на потискане на скоростта на растежа (I_r) тогава може да се изчисли за всяка изпитвана концентрация (третирана група) съгласно следната формула:

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

където:

% I_r : процентно потискане в средната специфична скорост на растеж;

μ_C : средна стойност на μ в контролата

μ_T : средна стойност на μ в третираната група

Добив

86. Тази зависима променлива се основава на промените в общата дължина на поника, общото свежо тегло на поника и общото сухо тегло на поника с течение на времето в контролите и всяка третирана група. Средното процентно потискане на добива (% I_y) може да се изчисли за всяка третирана група, както следва:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

където:

% I_y : процентното намаление на добива

b_C : крайната биомаса минус началната биомаса за контролната група

b_T : крайната биомаса минус началната биомаса в третираната група.

Построяване на кривите концентрация-отклик

87. Следва да се построят кривите концентрация-отклик, които свързват средното процентно потискане на зависимата променлива (I_r или I_y), изчислено както е показано по-горе, и логаритъма на концентрацията на изпитвания химикал.

Оценка на EC_x

88. Оценките на EC_x (например EC_{50}) следва да се основават както на средната специфична скорост на растеж ($E_r C_x$), така и на добива ($E_y C_x$), всяко от които на свой ред следва да се основава на общото свежо тегло на поника, общото сухо тегло на поника и общата дължина на поника.
89. Следва да се отбележи, че стойностите на EC_x , изчислени с помощта на тези две зависими променливи, не са сравними и тази разлика се разпознава, когато се използват резултатите от изпитването. Стойностите на EC_x , базирани на средната специфична скорост на растеж ($E_r C_x$), в повечето случаи ще бъдат по-високи от резултатите, базирани на добива ($E_y C_x$), ако са спазени условията за изпитване по настоящия метод за изпитване, което се дължи на математическата основа на съответните подходи. Тази разлика не следва да се интерпретира като разлика в чувствителността между двете зависими променливи — стойностите просто са различни от математическа гледна точка.

Статистически процедури

90. Целта е да се получи количествено съотношение концентрация-отклик чрез регресионен анализ. Може да се използва претеглена линейна регресия след извършване на линеаризираща трансформация на данните от отклика — например в пробит, или логит, или Вейбул единици (13), но предпочитаните процедури са тези на нелинейната регресия, които по-добре обработват неизбежните неравномерности и отклонения от гладките разпределения. При приближаване към нула

▼ **M7**

- или пълно инхибиране подобни неравномерности може да бъдат увеличени от трансформацията, като по този начин пречат на анализа (13). Следва да се отбележи, че стандартните методи на анализ с помощта на пробит, логит или Вейбул трансформации са предназначени за използване при двоични данни (например смъртност или преживяване) и следва да бъдат изменени, за да се приспособят към данните за скоростта на растежа или добива. Специфични процедури за определяне на стойности на EC_x от непрекъснати данни могат да се намерят в (14), (15), (16) и (17).
91. За анализа на всяка от зависимите променливи се използва съотношението концентрация-отклик, за да се изчислят точковите оценки на стойностите на EC_x . Определят се доверителните граници от 95 % за всяка от оценките и съгласуваността на данните от отклика с регресионния модел следва да се оцени графично или статистически. Регресионният анализ следва да се извърши, като се използват отклиците при индивидуалните повторения, а не средните стойности за третираните групи.
 92. Оценките на EC_{50} и доверителните граници могат да се получат също и чрез използване на линейна интерполация с bootstrap процедура (18), ако наличните регресионни модели/методи са неподходящи за данните.
 93. За оценяване на LOEC и оттам на NOEC е необходимо да се сравнят средните стойности от третиране, като се използват техники за дисперсионен анализ (ANOVA). Средната стойност за всяка концентрация след това се сравнява със средната стойност на контролата с помощта на съответния тест (напр. тестовете на Дънет или на Уилямс) (19) (20) (21) (22). Необходимо е да се оцени дали е удовлетворено допускането при ANOVA за нормално разпределение (НР) и хомогенност на дисперсията (ХД). Тази оценка следва да се извършва чрез теста на Шапиро-Уилкс (НР) или теста на Левин (ХД). Невъзможността за удовлетворяване на допускането за НР и хомогенност на дисперсиите понякога може да се коригира чрез логаритмична трансформация на данните. Ако хетерогенността на дисперсията и/или отклонението от НР са екстремални и не могат да се коригират чрез трансформация, следва да се обмисли анализ с методи като t-теста на Бонферони-Уелч, теста на Йонкхере-Терпстра със стъпка назад и теста на Бонферони за медианите. Допълнителни насоки относно определянето на NOEC могат да се намерят в (16).

ПРОТОКОЛИРАНЕ

94. Протоколът от изпитването включва следните данни:

Изпитван химикал

Вещество с една съставка:

- външен вид, разтворимост във вода и допълнителни относими физични и химични свойства;
- химична идентификация, като например наименование по IUPAC или CAS, CAS номер, код SMILES или InChI, структурна формула, чистота, химична идентичност на онечистванията, доколкото е целесъобразно и практически осъществимо, и т.н.

Вещество с повече съставки, UVCB и смеси:

- определени, доколкото е възможно, с химичната си идентичност (вж. по-горе), количествения състав и относимите физични и химични свойства на съставките.

Животински вид за изпитването

- Научно име и източник.

Условия на изпитване

- продължителност и условия на етапа на имплантация;
- използвана процедура на изпитване (статична, полустатична, импулсна);

▼ M7

- дата на началото на изпитването и неговата продължителност;
- среда за изпитване, т.е. седимент и течна хранителна среда;
- описание на плана на проучването: климатичната камера/помещение или лаборатория, съдове за изпитване и капаци, обем на разтворите, дължина и тегло на изпитваните растения за всеки отделен съд за изпитване в началото на изпитването, съотношение между повърхността на седимента и повърхността на водата, съотношение между обема на седимента и обема на водата;
- изпитвани концентрации (съответно номинална и измерена) и брой на повторенията за една концентрация;
- методи за приготвяне на изходните и изпитваните разтвори, включително използването на всякакви разтворители или диспергиращи средства;
- температура по време на изпитването;
- източник на светлина, облъчване ($\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
- стойности на pH за изпитваните и контролните среди, както и външен вид на средата за изпитване в началото и в края на изпитването;
- концентрации на кислород;
- метод за анализ със съответните данни за оценка на качеството (изследвания за валидиране, стандартни отклонения или доверителни граници на анализите);
- методи за определяне на измерваните променливи, напр. дължина, сухо тегло, свежо тегло;
- всички отклонения от настоящия метод за изпитване.

Резултати

- необработени данни: дължина на поника и тегло на поника на растенията/саксия и други измервани променливи във всеки съд за изпитване и във всеки контролен съд при всеки случай на наблюдение и анализ в съответствие с графика на измерванията, представен в таблица 1;
- средни стойности и стандартни отклонения за всяка измервана променлива;
- криви на растежа за всяка концентрация;
- време за удвояване/скорост на растежа в контролата въз основа на дължината и свежото тегло на поника, включително коефициент на вариация за добива по отношение на свежо тегло;
- изчислените зависими променливи за всяко третирано повторение, със средни стойности и коефициент на вариация за повторенията;
- графично представяне на взаимовръзката концентрация/въздействие;
- оценки на токсичните крайни точки за зависимите променливи, например EC_{50} и свързаните доверителни интервали. Ако са изчислени, LOEC и/или NOEC и статистическите методи, използвани за тяхното определяне;
- ако е използван ANOVA, размерът на въздействието, което може да се открие (например най-малката значима разлика);
- всяка стимулация на растеж, открита в което и да е третиране;

▼M7

- всякакви визуални признаци за фитотоксичност, както и наблюдения на изпитваните разтвори;
- обсъждане на резултатите, включително всякакво влияние върху резултата от изпитването вследствие на отклонения от настоящия метод за изпитване.

ЛИТЕРАТУРА

- (1) Глава В.26 от настоящото приложение: Изпитване на потискането на растежа на видове от род *Letna*.
- (2) Глава В.3 от настоящото приложение: Сладководни водорасли и цианобактерии, изпитване за потискане на растежа.
- (3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.
- (4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, pp. 199-206.
- (5) ISO 16191:2013 Water quality — Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of *Myriophyllum aquaticum* (Определяне на токсичното въздействие на седимент върху растежното поведение на *Myriophyllum aquaticum*).
- (6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, pp. 715-722.
- (7) Глава В.50 от настоящото приложение: Изпитване за токсичност без седименти при *Myriophyllum spicatum*.
- (8) Глава В.28 от настоящото приложение: Изпитване за токсичност за хиროномиди в система вода-седимент с използване на вода с добавка.
- (9) Ratte, M., H. Ratte (2014), „Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.
- (10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron — a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, pp. 231 — 237.
- (11) OECD (2000), „Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.
- (12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, pp. 251-263.
- (13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, pp. 713-718.
- (14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, pp. 157-167.
- (15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494.
- (16) OECD (2006), „Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application“, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.
- (17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, pp/ 93-96.

▼M7

- (18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
- (19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.
- (20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.
- (21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.
- (22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.

▼ M7*Допълнение 1***СЪСТАВ НА СРЕДА SMART И BARKO**

Съставка	Количеството реагент, прибавен към вода (*) (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	91,7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	69,0
NaHCO_3	58,4
KHCO_3	15,4
pH (въздушно равновесие)	7,9

(*) деминерализирана (т.е. дестилирана или дейонизирана) вода.

▼ M7

Допълнение 2

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Биомаса е свежото и/или сухото тегло на живите организми, съдържащи се в една популация. В това изпитване биомасата е сумата от основния поник, всички странични разклонения и всички корени.

Химикал означава вещество или смес.

Хлороза е промяната на цвета от зелен на жълтеникав на изпитван организъм, по-специално на прешлените.

ES_x е концентрацията на изпитвания химикал, разтворен в изпитваната среда, която води до x % (например 50 %) намаляване на растежа на *Muriophyllum spicatum* в рамките на определен период на експозиция (който трябва да бъде посочен изрично, ако се отклонява от пълната или нормалната продължителност на изпитването). С оглед на еднозначно обозначаване на стойността на ES, изведена от скоростта на растежа или от добива, символът „E_rC^{cc}“ се използва за скоростта на растежа, а „E_yC^{cc}“ се използва за добива, следван от използваната измервана променлива, например E_rC (дължина на основния поник).

Растеж е увеличение на измерваната променлива, например дължина на основния поник, обща дължина на страничните разклонения, обща дължина на поника, обща дължина на корените, свежо тегло, сухо тегло или брой на прешлените, за периода на изпитването.

Скорост на растеж (средна специфична скорост на растеж) е логаритмичното нарастване на измерваната променлива през периода на експозиция. *Забележка:* Зависимите променливи, свързани със скоростта на растежа, не зависят от продължителността на изпитването, доколкото моделът на растеж на неекспонираните контролни организми е експоненциален.

Най-ниска концентрация, при която се наблюдава въздействие (LOEC), е най-ниската изпитвана концентрация, при която за химикала се наблюдава статистически значимо въздействие за забавяне на растежа (при $p < 0,05$) в сравнение с контролата, в рамките на дадено време на експозиция. При все това, всички изпитвани концентрации над LOEC следва да имат вредно въздействие, равно или по-голямо от наблюдаваното при LOEC. Когато тези две условия не могат да бъдат удовлетворени, следва да се даде пълно обяснение за това как е била избрана LOEC (и следователно NOEC).

Измервани променливи са всички видове променливи, които се измерват с цел да се изрази крайната точка на изпитването с помощта на една или няколко различни зависими променливи. При този метод за изпитване измервани променливи са дължината на основния поник, общата дължина на страничните разклонения, общата дължина на поника, общата дължина на корените, свежото тегло, сухото тегло и броят на прешлените.

Монокултура е култура с един растителен вид.

Некроза е мъртва (т.е. бледа или тъмнокафява) тъкан на изпитвания организъм.

Концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC) е изпитваната концентрация непосредствено под LOEC.

Зависима променлива е променлива за оценяване на токсичността, получена от измервана променлива, описваща биомасата чрез различни методи на изчисление. При настоящия метод за изпитване скоростите на растежа и добивът са зависими променливи, получени от измервани променливи като дължина на основния поник, обща дължина на поника, свежо тегло, сухо тегло или брой на прешлените.

Полустатично изпитване (с обновяване) е изпитване, при което изпитваният разтвор периодично се подменя на определени интервали по време на изпитването.

Статично изпитване е метод за изпитване без обновяване на изпитвания разтвор по време на изпитването.

▼ M7

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

Крайна точка на изпитване описва като цел на изпитването общия показател, който ще бъде изменен от изпитвания химикал в сравнение с контролната проба. При настоящия метод за изпитване крайната точка на изпитването е потискането на растежа, което може да се изрази чрез различни зависими променливи на базата на една или повече измервани променливи.

Среда на изпитване е напълно синтетичната среда на растеж, върху която растат изпитваните растения, когато са подложени на въздействието на изпитвания химикал. Изпитваният химикал обикновено се разтваря в средата на изпитване.

UVСВ е вещество с неизвестен или променлив състав, сложен продукт от реакция или биологичен материал.

Добив е стойността на измервана променлива, чрез която се изразява биомасата в края на периода на експозиция минус измерваната променлива в началото на периода на експозиция. Забележка: Когато моделът на растеж на неекспонираните организми е експоненциален, зависимите променливи, базирани на добива, ще се понижат в хода на изпитването.