Този документ е средство за документиране и не обвързва институциите

►**B** **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
►**M1**	Регламент (ЕО) № 761/2009 на Комисията от 23 юли 2009 година	L 220	1	24.8.2009 г.
►**M2**	Регламент (ЕС) № 1152/2010 на Комисията от 8 декември 2010 година	L 324	13	9.12.2010 г.
►**M3**	Регламент (ЕС) № 640/2012 на Комисията от 6 юли 2012 година	L 193	1	20.7.2012 г.
►**M4**	Регламент (ЕС) № 260/2014 на Европейския парламент и на Съвета от 26 февруари 2014 година	L 81	1	19.3.2014 г.

▼B

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)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност,

като взе предвид Регламент (ЕО) № 1907/2006 на Европейския парламент и на Съвета от 18 декември 2006 г. относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH), за създаване на Европейска агенция по химикали, за изменение на Директива 1999/45/ЕО и за отмяна на Регламент (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 ([1]), и по-специално член 13, параграф 3 от него,

като има предвид, че:

(1) В съответствие с Регламент (ЕО) № 1907/2006 на общностно равнище следва да се приемат методи за изпитване за целите на изпитванията на вещества, когато подобни изпитвания се изискват, за да се събере информация за характерните свойства на веществата.

(2) Директива 67/548/ЕИО на Съвета от 27 юни 1967 г. за сближаването на законовите, подзаконовите и административните разпоредби относно класификацията, опаковането и етикетирането на опасни вещества ([2]) посочва в приложение V методите за определяне на физикохимичните свойства, токсичността и екотоксичността на веществата и препаратите. Приложение V към Директива 67/548/ЕИО се заличава с Директива 2006/121/ЕО на Европейския парламент и на Съвета, считано от 1 юни 2008 г.

(3) Методите за изпитване, съдържащи се в приложение V към Директива 67/548/ЕИО, следва да бъдат включени в настоящия регламент.

(4) Настоящият регламент не изключва прилагането на други методи на изпитване, при условие че те се прилагат в съответствие с член 13, параграф 3 от Регламент (ЕО) № 1907/2006.

([1]) ОВ L 396, 30.12.2006 г., стр. 1.

([2]) ОВ X 196, 16.8.1967 г., стр. 1. Директива, последно изменена с Директива 2006/121/ЕО на Европейския парламент и на Съвета (ОВ L 396, 30.12.2006 г., стр. 850) — *ще последва актуализация със съответни препратки веднага след публикуването на 30-то адаптиране към техническия прогрес*.

▼B

(5) Принципите на заместване, намаляване и усъвършенстване на използването на животни в процедури следва да бъдат взети предвид изцяло при изготвянето на методи на изпитване, по-специално в случаите, когато са налице подходящи одобрени методи, които да заместят, намалят или усъвършенстват изпитванията с животни.

(6) Разпоредбите на настоящия регламент са в съответствие със становището на комитета, създаден съгласно член 133 от Регламент (ЕО) № 1907/2006,

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

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

ЧАСТ А: МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ФИЗИКОХИМИЧНИ СВОЙСТВА

СЪДЪРЖАНИЕ

А.1.	ТЕМПЕРАТУРА НА ТОПЕНЕ/ЗАМРЪЗВАНЕ
А.2.	ТЕМПЕРАТУРА НА КИПЕНЕ
А.3.	ОТНОСИТЕЛНА ПЛЪТНОСТ
А.4.	НАЛЯГАНЕ НА ПАРИТЕ
А.5.	ПОВЪРХНОСТНО НАПРЕЖЕНИЕ
А.6.	РАЗТВОРИМОСТ ВЪВ ВОДА
А.8.	КОЕФИЦИЕНТ НА РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ
А.9.	ТОЧКА НА ВЪЗПЛАМЕНЯВАНЕ
А.10.	ЗАПАЛИМОСТ (ТВЪРДИ ВЕЩЕСТВА)
А.11.	ЗАПАЛИМОСТ (ГАЗОВЕ)
А.12.	ЗАПАЛИМОСТ (ПРИ КОНТАКТ С ВОДА)
А.13.	ПИРОФОРНИ СВОЙСТВА НА ТВЪРДИ ВЕЩЕСТВА И ТЕЧНОСТИ
А.14.	ЕКСПЛОЗИВНИ СВОЙСТВА
А.15.	ТЕМПЕРАТУРА НА САМОЗАПАЛВАНЕ (ТЕЧНОСТИ И ГАЗОВЕ)
А.16.	ОТНОСИТЕЛНА ТЕМПЕРАТУРА НА САМОЗАПАЛВАНЕ НА ТВЪРДИ ВЕЩЕСТВА
А.17.	ОКСИДИРАЩИ СВОЙСТВА (ТВЪРДИ ВЕЩЕСТВА)
А.18.	СРЕДНО БРОЙНО МОЛЕКУЛНО ТЕГЛО И РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА МОЛЕКУЛНОТО ТЕГЛО НА ПОЛИМЕРИ
А.19.	НИСКОМОЛЕКУЛНО ТЕГЛОВНО СЪДЪРЖАНИЕ НА ПОЛИМЕРИ
А.20.	ПОВЕДЕНИЕ НА РАЗТВАРЯНЕ/ЕКСТРАКЦИЯ НА ПОЛИМЕРИ ВЪВ ВОДА
А.21.	ОКСИДИРАЩИ СВОЙСТВА (ТЕЧНОСТИ)
А.22.	ПРЕТЕГЛЕНА СПРЯМО ДЪЛЖИНАТА СРЕДНОГЕОМЕТРИЧНА СТОЙНОСТ НА ДИАМЕТЪРА НА ВЛАКНА

▼M4

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

▼B

A.1. ТЕМПЕРАТУРА НА ТОПЕНЕ/ЗАМРЪЗВАНЕ

1. МЕТОД

Повечето от описаните методи се основават на Ръководството за провеждане на изпитвания на ОИСР (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 гореспоменатите 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 (K към ^{o}C)

$$t = T - 273{,}15$$

t: Целзиева температура, градус Целзий (^{o}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 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 — капилярен 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 капилярка**

1.4.1.1. *Устройства за температура на топене с течностна баня*

Малко количество от фино стритото вещество се поставя в капилярка и се стръсква в плътна маса. Капилярката 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 капилярката 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 капилярката 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 стапяне*

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 менискусът 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.

▼B

1.4.4.2. *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 K. 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 разпрашават	Вещества, които се разпрашават 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 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Устройства за температура на топене с метален блок	да	само в известна степен	от 293 до > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Отчитане с фотоклетка	да	няколко с допълнителни приспособления	от 253 до 573 K	± 0,5 K	

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

▼B

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

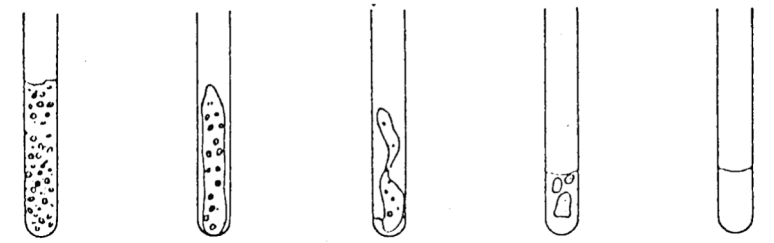
Процедурите на почти всички методи за изпитване са описани в международни и национални стандарти (вж. допълнение 1).

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 A (Начало на топенето): фини капчици полепват равномерно по вътрешната стена на капилярката.

Фаза B появява се просвет между пробата и вътрешната стена, който се дължи на свиване на стопилката.

Фаза C 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.

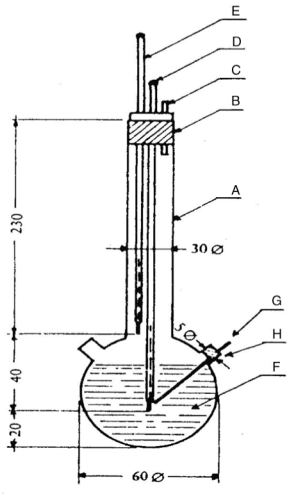
Фаза E (Крайна фаза на топенето): вече няма твърди частици.

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



A: Измервателен съд
B: Запушалка
C: Вентилационен отвор
D: Термометър
E: Спомагателен термометър
F: Течност за банята
G: Стъклена капилярка, дължина от 80 до 100 mm, вътрешен диаметър 1,0 ± 0,2 mm, дебелина на стената от 0,2 до 0,3 mm
H: Странична тръба

▼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 K, силиконово масло — за температури на топене не по-високи от 573 K.

За температури на топене над 523 K 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 K 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 K 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 K

T_D = температурата, отчетена по термометъра D в K

T_E = температурата, отчетена по термометъра E в K

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,

▼B

— нагревателна система за металния блок, осигурена например от електрическо съпротивление, включено в блока,

— реостат за регулиране на входното напрежение (ако се използва електрическо нагряване),

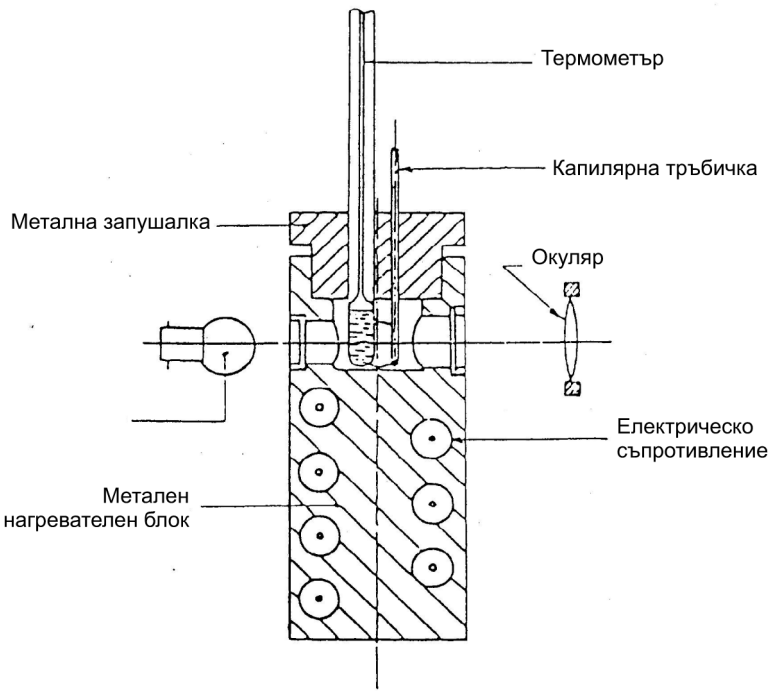
— четири прозорчета от термоустойчиво стъкло на страничните стени на камерата, диаметрално разположени и под прав ъгъл едно спрямо друго. Пред едно от тези прозорчета се монтира окуляр за наблюдение на капилярката. Другите три прозорчета се използват за осветяване на вътрешността на апарата с помощта на лампи,

— капилярка 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 капилярки 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 капилярката.

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) ОИСР, Paris, 1981, Test Guideline 102, решение на Съвета C(81) 30 окончателен.

(2) IUPAC, B. Le Neidre, 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 congelation) (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 ОИСР (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, прегрупировка, разграждане и др.). Методите могат да се прилагат за чисти и за непречистени течни вещества.

Акцентира се на методите, които използват отчитане с фотоклетка 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:

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

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 J mol^{-1} 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 капилярка, 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 K (до 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (до 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Динамичен метод	± 0,5 K (до 600 K) (2)	
Дестилационен процес (област на кипене)	± 0,5 K (до 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
По Сиволобоф	± 2 K (до 600 K) (2)	
Отчитане с фотоклетка	± 0,3 K (при 373 K) (2)	
Диференциална термична калориметрия	± 0,5 K (до 600 K) ± 2,0 K (до 1 273 K)	ASTM E 537-76
Диференциална сканираща калориметрия	± 0,5 K (до 600 K) ± 2,0 K (до 1 273 K)	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.

▼B

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 A.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)**

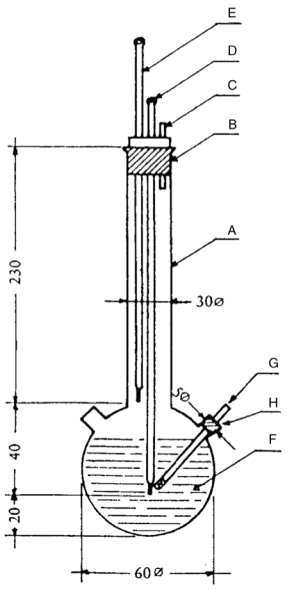
Вж. допълнението

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



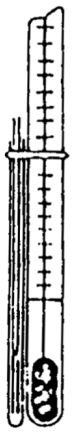
A: Измервателен съд
B: Запушалка
C: Вентилационна тръбичка
D: Термометър
E: Спомагателен термометър
F: Течност на банята
G: Епруветка за пробата, максимум 5 mm външен диаметър; съдържа капилярка с дължина приблизително 100 mm; приблизителен вътрешен диаметър 1 mm и приблизителна дебелина на стената от 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).

▼B

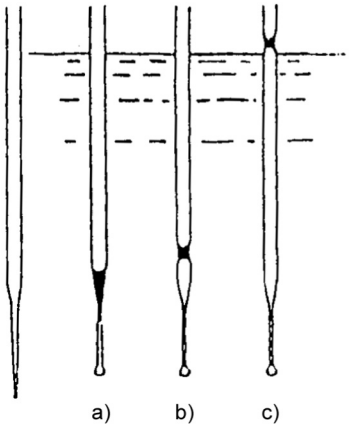
Фигура 2

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 нагряването 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 нагряването 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 (a), и се засмуква малко количество от пробата. Отвореният край на изтънената капилярка се затваря чрез стопяване така, че в края да се разположи малко въздушно мехурче. При нагряването 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 (c).

1.6.5. **Отчитане с фотоклетка**

Пробата се нагрява 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 ºC), без да се налагат промени в апарата. Приборът просто трябва да се постави в охлаждаща баня.

▼B

1.6.6. **Термичен анализ**

1.6.6.1. *Диференциален термичен анализ*

Вж. допълнението.

1.6.6.2. *Диференциална сканираща калориметрия*

Вж. допълнението.

2. **ДАННИ**

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:

Δp = (101,325 - p) [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 наляганията 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) ОИСР, Paris, 1981, Test guideline 103, решение на Съвета C(81) 30 окончателен.

(2) IUPAC, B. Le Neidre, 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.

▼B

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).

▼B

А.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 „p“ е частното на масата „m“ и обема „v“.

В системата SI плътността „p“ 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. Плътността 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)

Плътността 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)

Плътността 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.

▼B

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. **ПРЕПРАТКИ**

(1) ОИСР, 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 Fluessigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol. 11, 427—430.

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

(6) Baumgarten, D., Fullmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen — Verfahren zur Dichtebestimmung bei fluessigen 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.

▼B

Допълнение

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

1. **Методи със сила на изтласкване**

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 A: 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 100.10^{-6} m^2 s^{-1} at 15 °C) (Пикнометър на Липкин (за течности с кинематичен вискозитет, по-малък от 100.10^{-6} m^2 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 pyenometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $l00.10^{-6}$ m^2 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 кинематиченвискозитет по-малък от 100.10^{-6} m^2 s^{-1} при 20 °C, приложим по-специално също и за въглеводороди 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 — Pyknometric 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 B: 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 — Pyknometric 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, по-специално 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 течно 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 Torr	= 1 mm Hg	= $1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 атмосфера	= $1{,}013 \times 10^5$ Pa	
1 bar	= 10^5 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.

▼**M1**

Таблица 1

Метод на измерване	Вещества		Оценка повторяемост	Оценка възпроизводимост	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 изотенископа	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: Кнудсенова клетка	Да	Да	от 10 до 30 %	—	от 10^{-10} до 1 P
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:

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

където:

p = налягането на парите в паскали

ΔHv = скритата топлина на изпарение в J mol^{-1}

R = универсалната газова константа, 8,314 J 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.

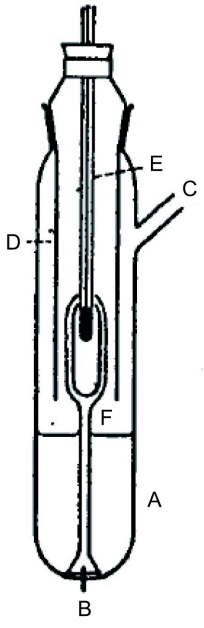
1.5. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

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

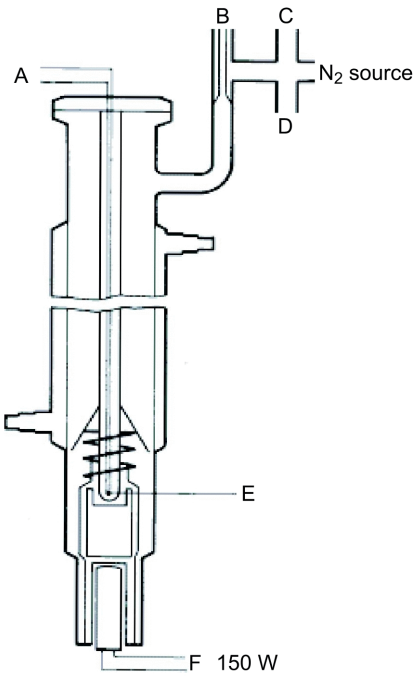
1.5.1.1. *Принцип*

Наляганeто 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, манастат 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**

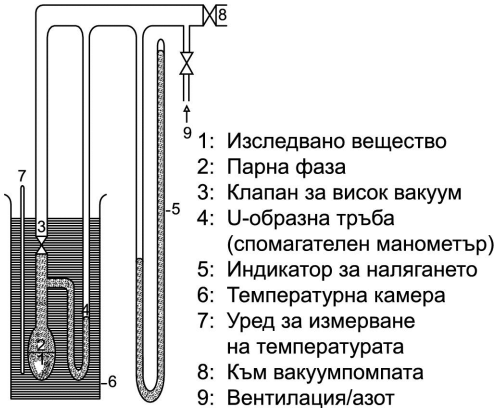
1.5.2.2. *Апаратура*

Оборудването се състои от термостатирана вана (точност ± 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 капацитивни манометри с нагряваща се мембрана. Температурата се измерва върху външната стена на съда, съдържащ пробата, или вътре в самия съд.

1.5.2.3. *Методика*

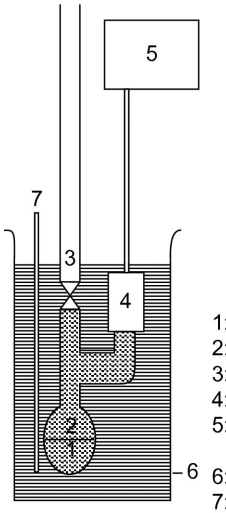
При използване на апарата в съответствие с фигура 3а U-образната тръба се напълва с избраната течност, която трябва да се дегазира при повишена температура, преди да започне отчитането. Изпитваното вещество се поставя в апарата и се дегазира при понижена температура. В случая на многокомпонентна проба 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



1: Изследвано вещество
2: Парна фаза
3: Клапан за висок вакуум
4: U-образна тръба (спомагателен манометър)
5: Индикатор за налягането
6: Температурна камера
7: Уред за измерване на температурата
8: Към вакуумпомпата
9: Вентилация/азот

Фигура 3б



1: Изследвано вещество
2: Парна фаза
3: Клапан за висок вакуум
4: Манометър
5: Прибор за измерване на налягането
6: Температурна камера
7: Уред за измерване на температурата

▼**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. Необходимото 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 уравновесява 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*

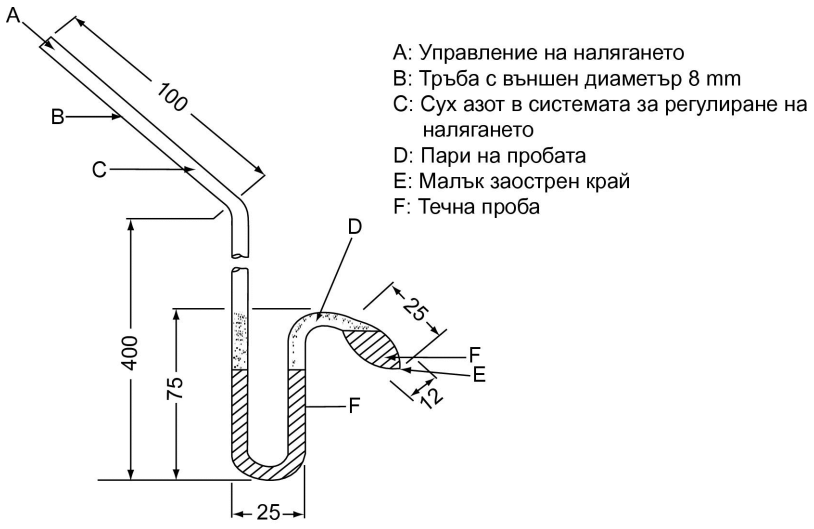
Пример за измервателен уред е показан на фигура 4. Можете да намерите пълно описание в ASTM D 2879—86 (6).

▼**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



(Размери в mm)

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 загрява в малка пещ 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 изпусканите 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):

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

където:

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

M = моларната маса (g mol^{-1})

T = температурата (K)

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

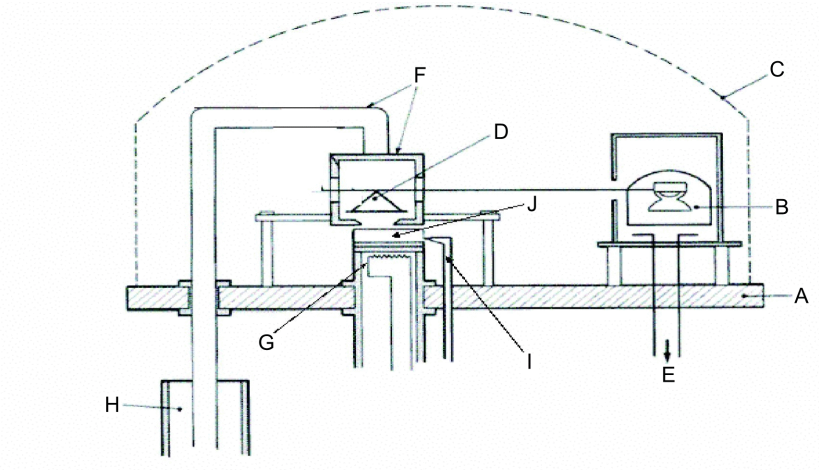
P = налягането на парите (Pa)

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

B: Измервателен уред от магнито-електричната система

C: Стъклен звънец

D: Везна с блюдо

E: Устройство за измерване на подналягане

F: Хладилна камера и охлаждаща шина

G: Изпарителна пещ

H: Дюаров съд с течен азот

I: Измерване на температурата на пробата

J: Изследвано вещество

▼**M1**

1.5.5. **Ефузионен метод: Кнудсенова клетка**

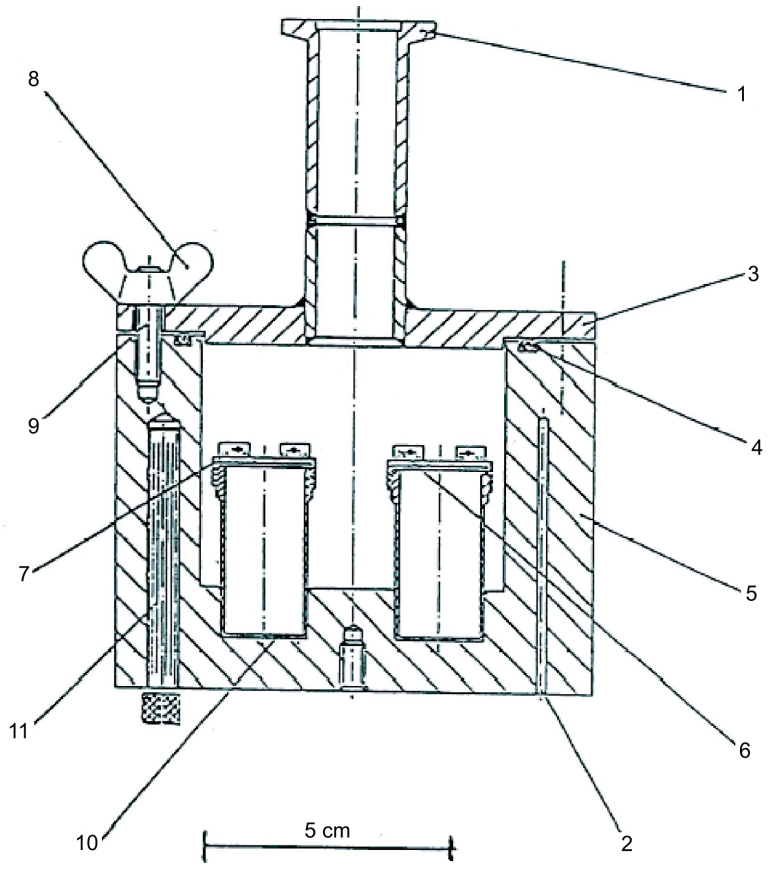
1.5.5.1. *Принцип*

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

▼**M1**

1.5.6. **Ефузионен метод: изотермична термогравиметрия**

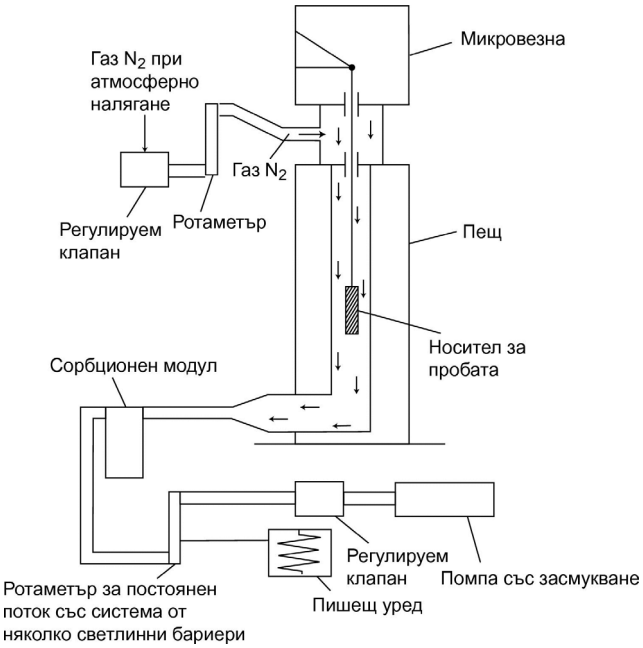
1.5.6.1. *Принцип*

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:

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

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:

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

където A и B са константи, които се получават чрез регресионен анализ на log pT 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 наляганията 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.

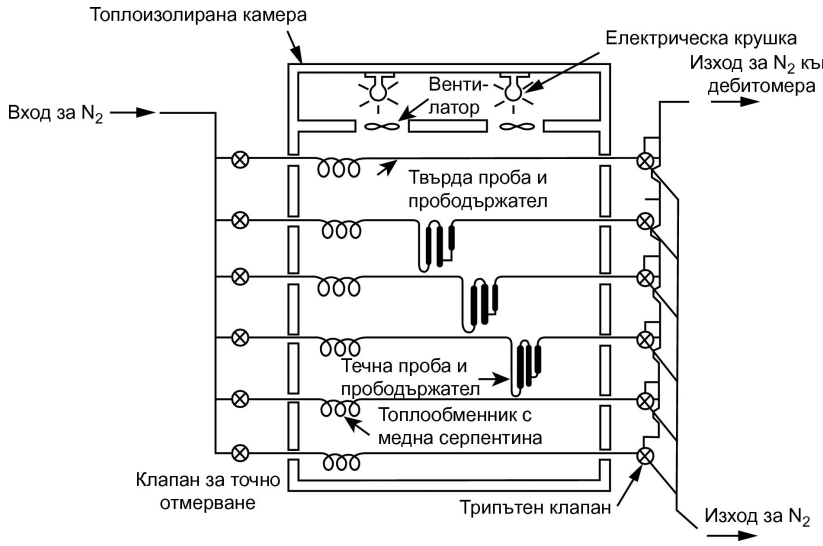
Методиката с насищане на газ е приложима за твърди и течни вещества. Тя може да се използва за налягания на парите до минимум 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Методът е най-надежден за налягания на парите под 10^3 Pa. Над 10^3 Pa за наляганията на парите по принцип се определят завишени стойности, вероятно 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 ± 0,5 °C или по-висока.

▼**M1**

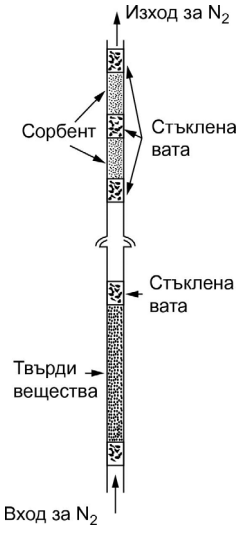
Фигура 8



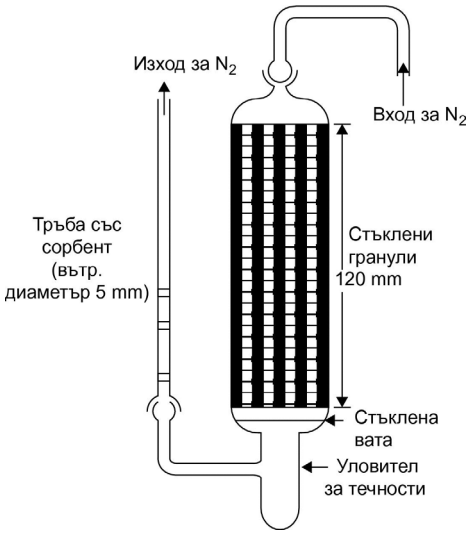
В общия случай като инертен газ носител се използва азот, но в някои случаи може да е необходимо да се използва друг газ (24). Газът носител трябва да бъде сух. Газовият поток се разделя на 6 потока, управлявани с иглени клапани (диаметър на отвора приблизително 0,79 mm), и навлиза в камерата през медна 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 запушалки 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 (CO_2) уловители са друг ефикасен начин за натрупване на изпареното вещество. Те не пораждат 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 дебити 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 (m^3)

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**

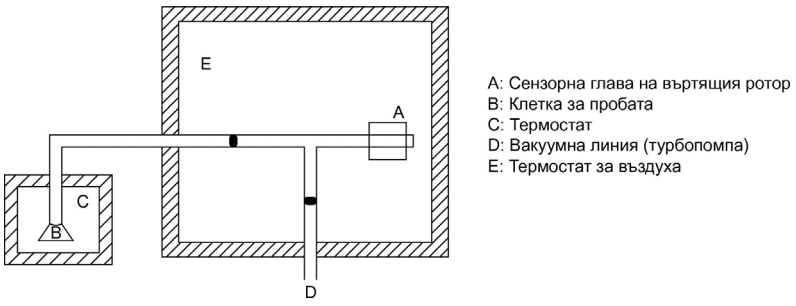
1.5.8.1. *Принцип*

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 въртеливо 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. Наляганото на парите се получава от забавянето на стоманеното топче, което зависи от наляганото. 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 наляганото на парите трябва да се определи поне за две температури. За да се провери линейността на кривата на наляганото на парите, е за предпочитане да се направят три или повече измервания в интервала 0 ÷ 50 °C. В случая на ефузионния метод (кнудсенова клетка и изотермична термогравиметрия) и на метода с насищане на газ вместо 0 ÷ 50 °C се препоръчва температурен интервал на измерване 120 ÷ 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 ÷ 50 °C (или 120 ÷ 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., Stammbach, 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., Ritttig, 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., Ritttig, 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 наляганeто 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

Наляганeто 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 наляганията 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

Наляганeто на парите се изчислява, както следва:

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

където:

T = температурата, за която се прави изчислението

T_b = нормалната температура на кипене

P_{VP} = наляганeто 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:

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

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

(а) 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).

▼B

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-поделиница)

1 N/m = 10^3 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 отделят 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 ОИСР 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 ± 10^{-6} N, което съответства на грешка в границите на ± 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.

▼B

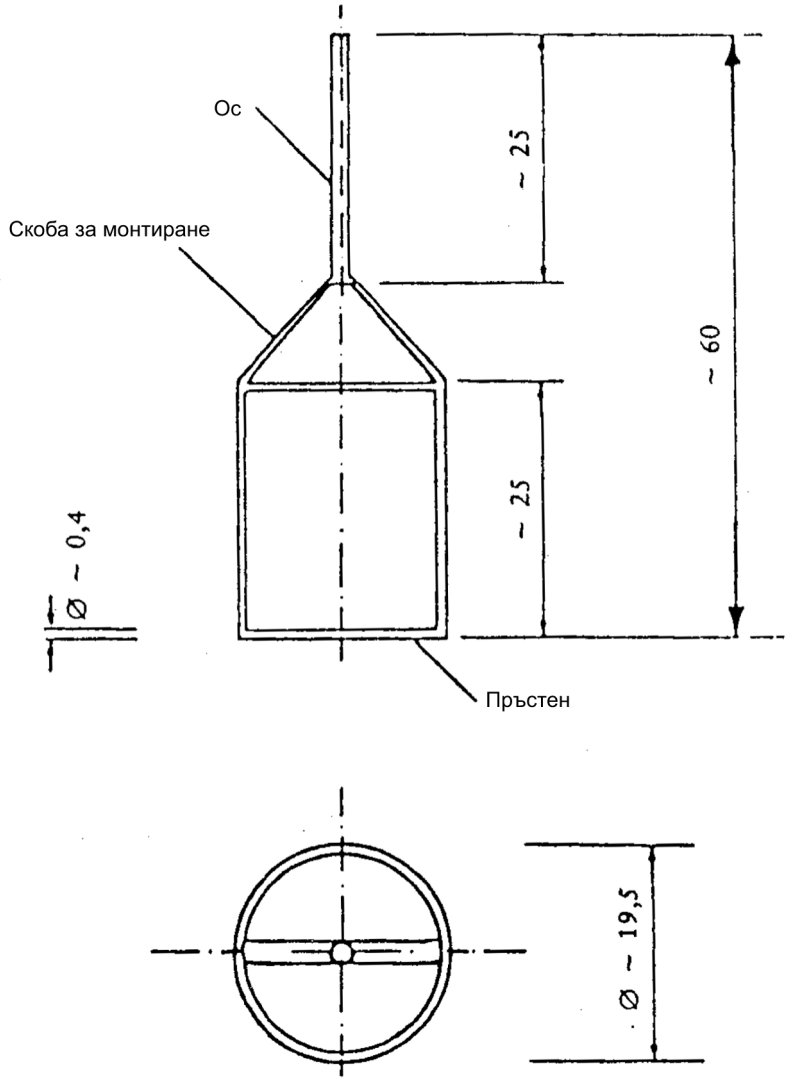
1.6.4.1.3. Измервателно тяло (пръстен)

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.

▼B

1.6.4.2. *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 течаща 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.

Калибриращи процедури

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

а) 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):

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

където:

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

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):

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

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 веществата, които не съдържат неразтворени вещества.

Разтворът трябва да се поддържа при постоянна температура (± 0,5°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 ± 0,5°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 отделя 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 п овърхностно напрежение

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

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

▼B

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 $\rho = 1\ g/cm^3$ и се отнася за пръстен с размери R = 9,55 mm (среден радиус на пръстена) и r = 0,185 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) ОИСР, 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

A.6. РАЗТВОРИМОСТ ВЪВ ВОДА

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоен на Указание за изпитване 105 на ОИСР (ОИСР TG 105) (1995 г.). Настоящият метод за изпитване е преработена версия на оригиналното ОИСР 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 pH.

3. В настоящия метод за изпитване са описани два метода — методът на елуиране от колона и методът на стъкленицата, 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 ± 0,5 ° C. Избраната температура трябва да се поддържа постоянна във всички относими части на оборудването.

Предварително изпитване

8. Чрез прилагане на поетапна процедура се добавят нарастващи обеми вода при стайна температура към приблизително 0,1 g от пробата (твърдите изпитвани вещества трябва да се привеждат в прахообразно състояние) в мерителен цилиндър със стъклена запушалка с вместимост 10 ml. След всяко прибавяне на дадено количество вода сместа се разклаща в продължение на 10 минути и визуално се проверява за наличието на неразтворени частици от пробата. Ако след прибавянето на 10 ml вода пробата или частици от нея останат неразтворени, опитът се продължава в мерителен цилиндър с вместимост 100 ml. Приблизителната разтворимост е дадена в таблица 1 по-долу под онзи обем вода,

▼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 стъкленицата.

Таблица 1

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

Метод на елуиране от колона

Принцип

9. Настоящият метод се основава на елуиране на изпитваното вещество с вода от 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

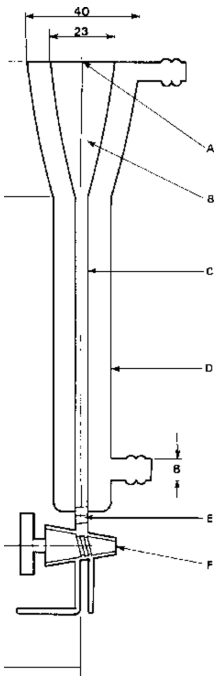
10. Апаратът се състои от микроколона (фигура 1), поддържана при постоянна температура. Тя е свързана или с рециркулационна помпа (фигура 2), или с нивелиращ съд (фигура 3). Микроколоната съдържа инертен носител, закрепен на място с малка запушалка от стъклена вата, която служи и за филтруване на твърдите частици. Материалите, които могат да се използват като носители, са стъклени перли, диатомит или други инертни материали.

11. Микроколоната, показана на фигура 1, е подходяща за постановката с рециркулационна 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 рециркулационната помпа, с която могат да се подават приблизително 25 ml/h. Рециркулационната помпа може да бъде например перисталтична или мембранна помпа. Трябва да се вземат мерки да не се допусне замърсяване и/или адсорбция на веществото от материала, от който е направена тръбичката.

12. Схематично подреждане при използване на нивелиращ съд е показано на фигура 3. При това подреждане микроколоната е оборудвана с еднопосочен спирателен кран. Връзката към нивелиращия съд се състои от шарнир от шлифовано стъкло и тръбичка, направена от инертен материал. Обемната скорост на потока от нивелиращия съд следва да бъде приблизително 25 ml/h.

▼**M4**

Фигура 1



Размерите са в mm

A. Връзка за шарнир от шлифовано стъкло

B. Входно разширение

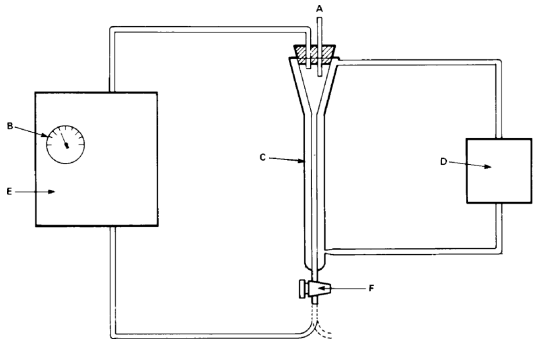
C. Вътрешна част 5

D. Външна част 19

E. Тапа от стъклена вата

F. Спирателен кран

Фигура 2



A. Атмосферно уравновесяване

B. Дебитометър

C. Микроколона

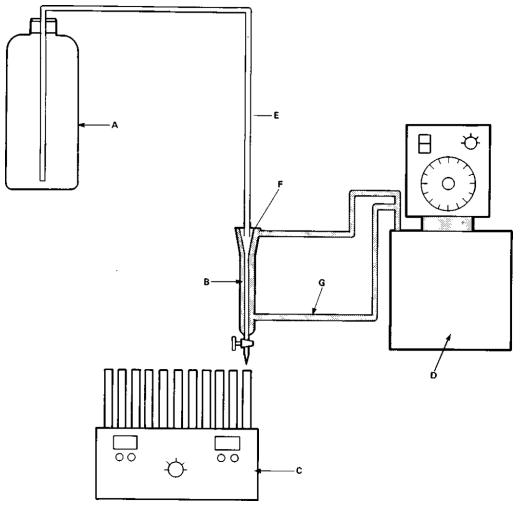
D. Термостатирана циркулационна помпа

E. Рециркулационна помпа

F. Двупосочен кран за отбиране на проби

▼**M4**

Фигура 3



A. Нивелиращ съд (например колба с обем 2,5 литра)

B. Колона

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 микроколона, като се дават два часа за уравновесяване.

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 рециркулационна помпа

15. Потокът през колоната се стартира. Препоръчително е да се използва обемна скорост на потока от приблизително 25 ml/h, съответстваща на 10 обема на описаната тук колона за час. Първите най-малко пет колонни обема се изхвърлят, за да се отстранят разтворимите във вода примеси. След това помпата се оставя да работи, докато се установи равновесие, като настъпването на равновесието се определя от пет последователни проби, чиито концентрации, взети в произволен ред, не трябва да се различават една от друга с повече от ± 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 ± 30 % при най-малко пет последователни фракции, се използват за определяне на разтворимостта.

17. Предпочитаният елуент е бидестилирана вода. Може да се използва също и дейонизирана вода със специфично съпротивление над 10 Mohm.cm и общо съдържание на органичен въглерод под 0,01 %.

18. По двете процедури се извършва втори опит, при който обемната скорост на потока е равна на половината от обемната скорост при първия опит. Ако резултатите от двата опита са близки, изпитването се счита за успешно. Ако при по-малка обемна скорост на потока се получи по-голяма разтворимост, намаляването на обемната скорост на потока наполовина продължава, докато при два последователни опита се получи една и съща разтворимост.

19. По двете процедури фракциите трябва да се проверяват за наличието на колоидни частици чрез изследване за Тиндалов ефект. Наличието на такива частици прави изпитването невалидно и изпитването трябва да се повтори, след като се подобри филтруването от колоната.

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

Метод на стъкленицата

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 °C. Следва да се използват клатачни машини или бъркалки, които могат да работят при постоянна температура, например магнитна бъркалка в термостатирана водна баня. След един ден се извършва уравновесяване на един от съдовете в продължение на 24 часа при температурата на изпитването, като същият периодично се разклаща. След това съдържанието на съда се 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 уравновесяване 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 уравновесяване.

24. Изпитването може да се извърши също без предварителна инкубация при 30 °C. За да се определи скоростта, с която се установява равновесието на насищане, се вземат проби до преустановяване на влиянието на времето на разбъркване върху измерената концентрация.

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

Аналитични 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 pH за всяка проба,

— средните стойности и стандартните отклонения на най-малко пет проби от платото на насищане при всеки опит,

— средната стойност от най-малко два последователни опита,

— температурата на водата по време на процеса на насищане,

— методът на анализ,

— природата на носителя,

— натоварването на носителя,

— използваният разтворител,

— данните за евентуална химична неустойчивост на веществото в процеса на изпитването,

— всякаква информация, относима към интерпретирането на резултатите, особено по отношение на примесите и агрегатното състояние на веществото.

▼**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,

— pH 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 етикетирането 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

▼B

A.8. КОЕФИЦИЕНТ НА РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ

1. МЕТОД

Методът на „разклащането в стъкленица“ се основава на Ръководството за провеждане на изпитвания на ОИСР (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 pH, най-малко една единица по-ниско (свободна киселина) или по-високо (свободна база) от pK на веществото.

Този изпитвателен метод обхваща две отделни процедури: метод на разклащането в стъкленица 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 стъкленица 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 стъкленица. Независимо от това и при този метод в някои случаи присъствието на примеси може да доведе до трудно интерпретиране на резултатите, защото определянето на пиковете става несигурно. За смеси, които дават недобро разделяне на пиковете, 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 стъкленица

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 P стойност, трябва да се начертае калибрационна графика на log P 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 P_{ow}, по-високо от това на изпитваното вещество, а друго съединение за сравнение да има P_{ow}, по-ниско от това на изпитваното вещество. За стойности на log P по-малки от 4 калибрирането трябва да се основава на данни, получени по метода на разклащането в стъкленица. За стойности на log P 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 P_{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 P_{ow} стойности.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

1.4.1. **Метод на разклащането в стъкленица**

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 въглеводородни 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 въглеводородна 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 въглеводородната 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

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

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 ± 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 ± 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 стъкленица

Законът на Нернст за разпределението се отнася само за разредени разтвори при постоянна температура, налягане и pH. 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; pH на буфера трябва да се различава от pK_a на веществото с поне една pH единица и винаги трябва да се внимава дали това pH 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 стъкленица**

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 клатачка. 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.

▼B

1.6.2.4. *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 отчитащо 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; пиковете 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 pH на елуиращия агент е важна за съединенията, които могат да преминават в йонна форма. Тя трябва да бъде в работната pH-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 pH 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 K.

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 n-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 $t_r(_{nc+1})$ се нанасят на графика като функция на $t_r(_{nc})$, а отрязъкът „a“ и наклонът „b“ се определят по регресионното уравнение:

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

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

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

▼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 стъкленица. 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 стъкленица

Надеждността на определените стойности на P 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 стъкленица:

— 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,

— pH 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 pH, pH 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,

— pH, 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) ОИСР, 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-Nygaerd, 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 Laboratori-umpraxis (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 Activitaetvon 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.

▼B

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 стъкленица се прилага в областта: l og 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 стъкленица),

— 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:

$$P_{\text{прибл}} = \frac{\text{насимен } c_{\text{n-октанол}}}{\text{насимена } c_{\text{вода}}}$$

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 Ханш

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

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

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

Например:

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

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:

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

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 мултиплкационен регресионен анализ (в) (з). Определянето на членовете, отчитащи вътрешномолекулните взаимодействия, става по редица от правила, описани в препратки (д) (з) (и).

Метод на Ханш и Лео

Според Ханш 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 Ханш 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, Pharmacochemistry 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.

▼B

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	Трихлороетилен	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-трихлрбензен	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 кРа, 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: ^{o}C

$t = T - 273,15$

(t в ^{o}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 $2^{o}C$.

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 cm^3, 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. **ДАННИ**

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 разпрашен метал, защото гасенето на пожара е свързано с много трудности. Разпрашените 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 разпрашени 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 разпрашени 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 разпрашени 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 cm^2.

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. Разпрашените 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.

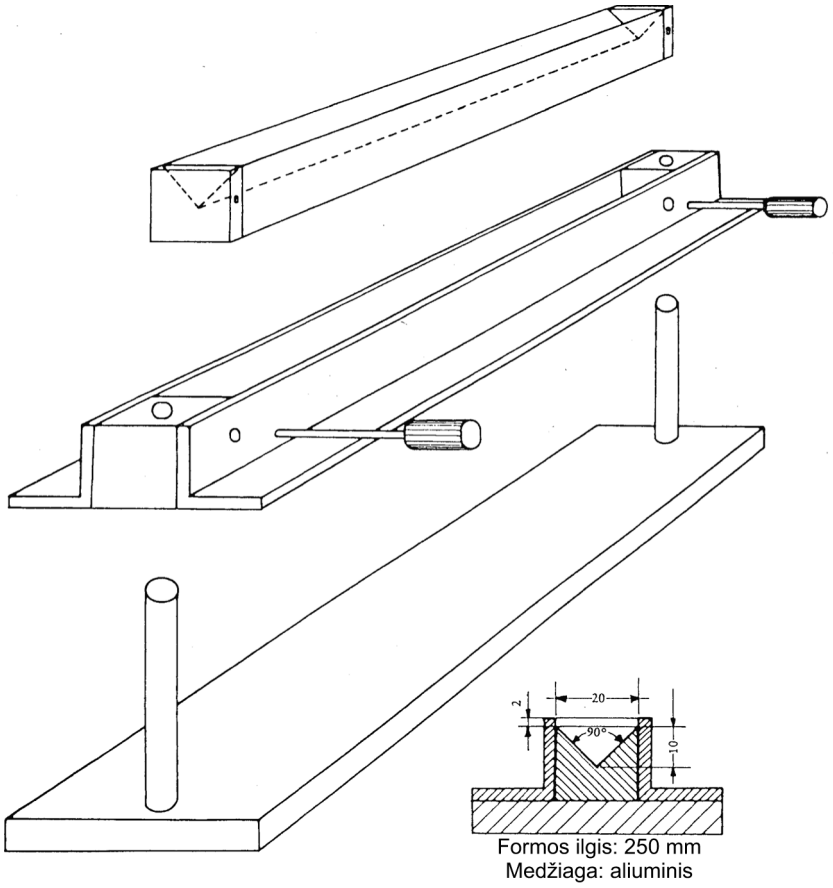
▼B

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 концентрации 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 пропорционираща 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 Standart-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.

▼B

1.6.4. **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 μm. 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 °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 A.11.

2. **ДАННИ**

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.

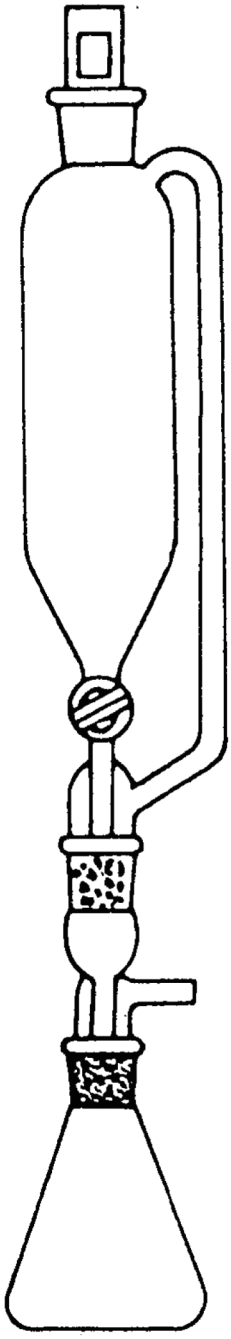
(2) NF T 20-040 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼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 A.15 Температура на самозапалване (течности и газове).

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Не са определени.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Веществото, твърдо или течно, се смесва с инертен носител и се привежда 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 cm^3 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 cm^3 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.

▼B

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:

а) 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, закрита 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.

▼B

1.6.1.2. *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 способи 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 геловете се изсипват в тръбата до височина 60 mm, като се внимава, особено при геловете, 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.

Нагряването 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 нагряване трябва да бъде такава, каквато е описана на фигура 3. При всички апарати скоростта на нагряване 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, нагряването 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 mm^3 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:

а) стритите вещества се пресяват през сито с размер на отворите 0,5 mm; целият материал, преминал през ситото, се използва за изпитването;

б) 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.

▼B

1.6.2.3. *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 (грапавост 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 mm^3 или друг подходящ за алтернативния апарат.

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

а) 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 напряко 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 (пращене и/или гръм или избухване в пламъци са равносилни на експлозия) поне веднъж при всеки от опитите с утвърдената фрикционна апаратура, или ако задоволява еквивалентните критерии при алтернативно изпитване.

2. **ДАННИ**

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, прашене 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.

▼B

Допълнение

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

(1) Тръба: спецификации на материалите № 1.0336.505 g

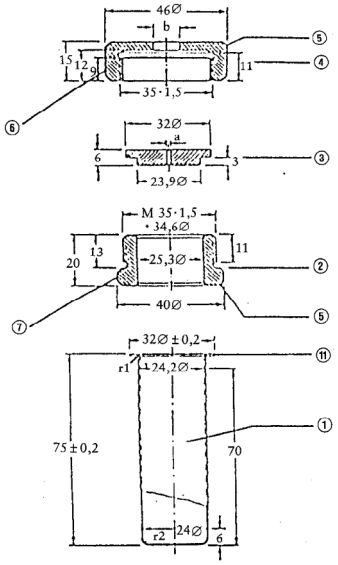
(2) Плочка с отверстия: спецификация на материалите № 1.4873

(3) Резбована втулка и гайка: спецификация на материалите № 1.3817

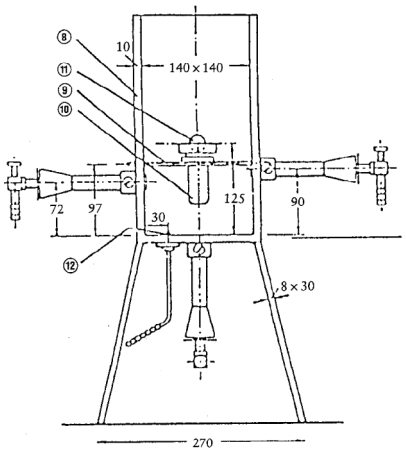
Фигура 1

Апарат за измерване на термичната чувствителност

(всички размери са в милиметри)



Фиг. 1а Стоманена тръба и спомагателни приспособления



Фиг. 1б Нагревателни и защитни приспособления

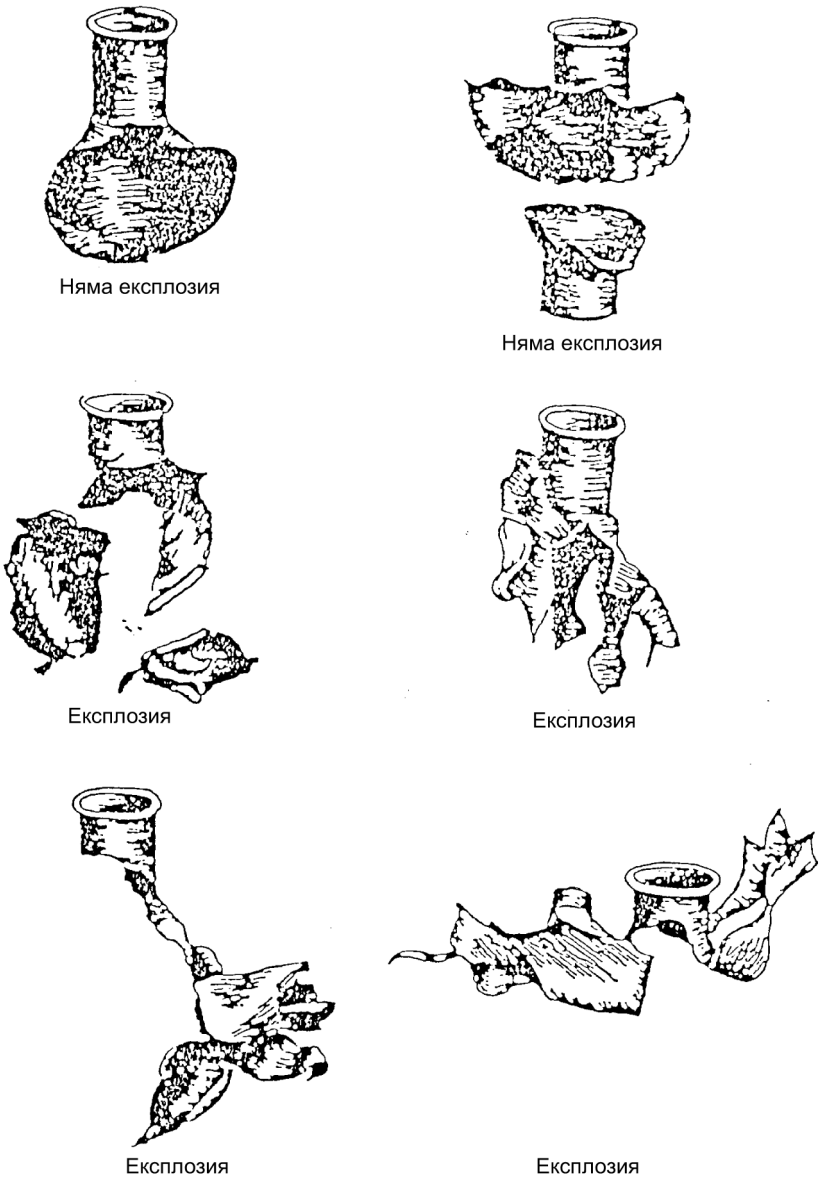
(1) тръба
(1а) външен фланец
(2) резбована втулка; резба с ниска степен на триене
(3) плочка с отвор a = 2,0 или 6,0 mm в диаметър
(4) гайка Ь = 10 mm в диаметър
(5) повърхност с жлебове
(6) две плоскости за гаечен ключ размер 41
(7) две плоскости за гаечен ключ размер 36
(8) камера, предпазваща от летящи 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

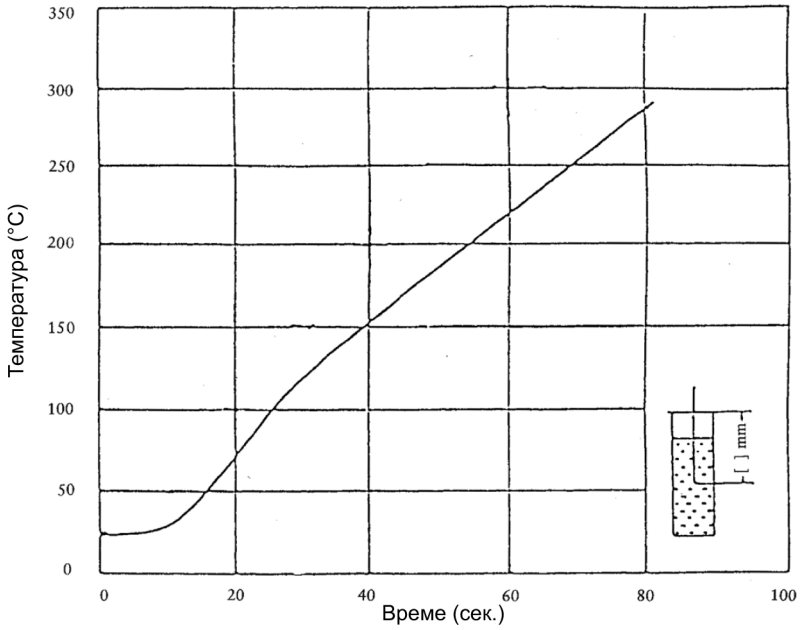
(примери за фрагментиране)



▼B

Фигура 3

Калибриране на скоростта на нагряване за изпитването на термичната чувствителност



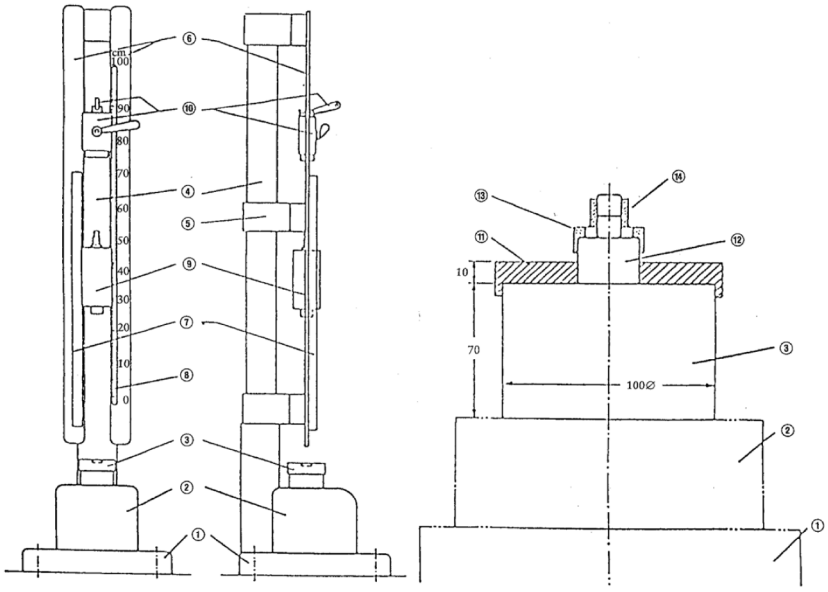
Крива температура/време, получена при нагряването на дибутилфталат (27 cm^3) в затворена тръба (с плоча с отвор 1,5 mm) посредством пропанов пламък със скорост 3,2 l/min. Температурата е измерена с хромалумелова термодвойка, обшита с неръждаема стомана с диаметър 1 mm и разположена централно на разстояние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

▼B

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

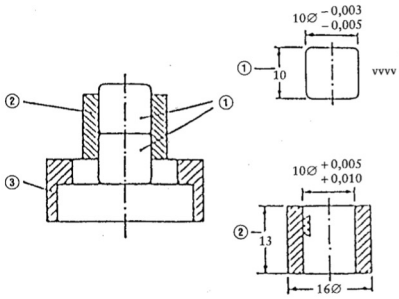
Фиг. 46 Падащ чук, долна част

(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

▼B

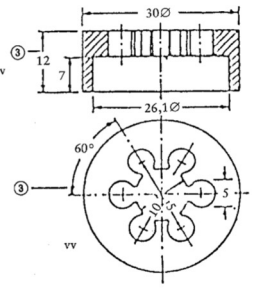
Фигура 4

Продължение

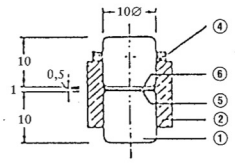


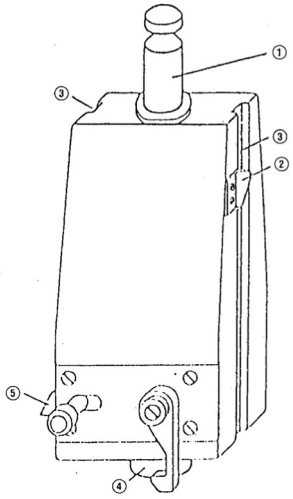
Фиг. 4в Устройство за удар върху вещества в прахообразна или пастообразна форма

(1) стоманен цилиндър
(2) водещ пръстен за стоманените цилиндри
(3) локализиращ пръстен с отвори
(a) вертикален срез
(b) хоризонтален срез
(4) гумен пръстен
(5) течност (40 mm^3)
(6) пространство без течност



Фиг. 4г Ударно устройство за течни вещества





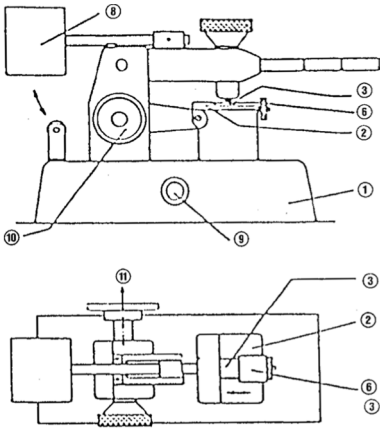
Фиг.4д Чук (падаща маса от 5 kg)

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

▼B

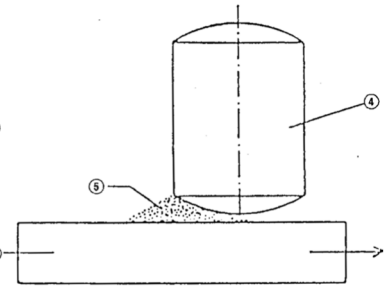
Фигура 5

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 mm^3



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 самозапалват 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 самозапалване 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 самозапалване се изразява чрез температурата на самозапалване. Температурата на самозапалване 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 самозапалване, 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 ТВЪРДИ ВЕЩЕСТВА

1. МЕТОД

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

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

Целта на това изпитване е да се осигури предварителна информация за самозапалването 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 самонагряване, което води до самозапалване. Следователно самозапалване 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 самозапалване трябва да се използва само за сравнителни цели.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕРНИ ЕДИНИЦИ

Температурата на самозапалване, получена по този метод, е минималната температура на околната среда в ^{o}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 ^{o}C (или до точката на топене на веществото, ако тя е по-ниска) при скорост на повишаване 0,5 ^{o}C/min. Във връзка с целта на това изпитване температурата на пещта, при която температурата на пробата достигне 400 ^{o}C чрез самонагряване, се нарича температура на самозапалване.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.6.1. **Апаратура**

1.6.1.1. *Пещ*

Температурно програмирана лабораторна пещ (вместимост 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.

▼B

1.6.1.2. *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. **ДАННИ**

За оценяване се използва температурата на пещта, при която температурата на пробата достигне 400 °C чрез самонагряване (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.

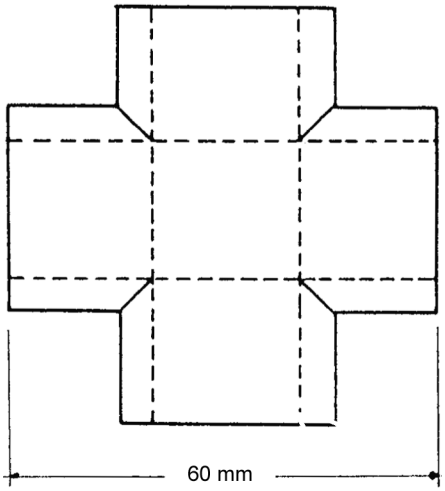
4. **ПРЕПРАТКИ**

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

▼B

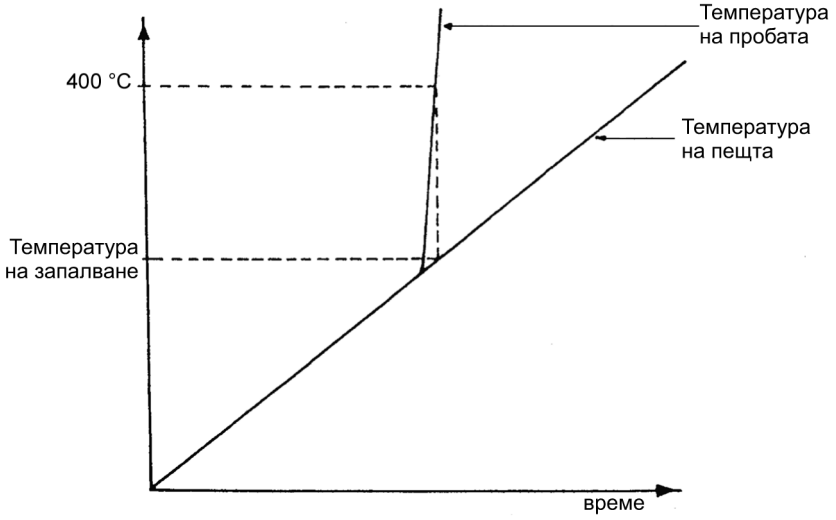
Фигура 1

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:

Сместе от окислители 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 валяк. 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 снема 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.

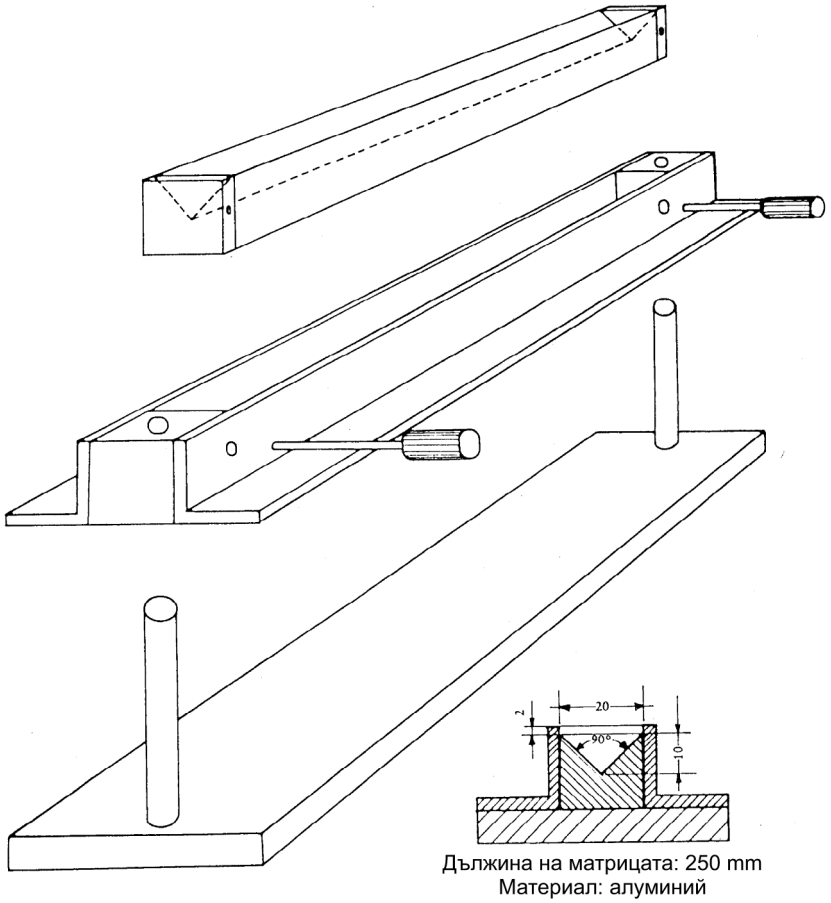
▼B

Допълнение

Фигура

Матрица и спомагателни приспособления за приготвяне на купчинката

(всички размери са в милиметри)



Дължина на матрицата: 250 mm
Материал: алуминий

▼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 ОИСР 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 тегловно 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 елуиращия 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:

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

(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 обикновено са между 40 и 100 µl. Възможни са и по-големи обеми, но те не трябва да превишават 250 µl. 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 тетрахидрофуран (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 µm.

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 капиляри 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 пористи 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:

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

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:

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

където:

$V_{ey,\,Mx}$ = елуиращия обем за полистирол с молекулно тегло M_x

$V_{ey(10Mx)}$ = елуиращия 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 пиковете, обемът на кюветката на детекторната клетка трябва да се поддържа възможно най-малък. Той не трябва да бъде по-голям от 10 µl, 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.

▼B

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 разреденият 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) Schrîder, 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 ОИСР 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 тегловно 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 елуиращия 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 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 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 нискомолекулните 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 µl. Възможни са и по-големи обеми, но те не трябва да превишават 250 µl. 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 тетрахидрофуран (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 µm.

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.

▼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 капиляри 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).

▼B

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:

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

където:

N = броя на теоретичните пластини

V_e = елуиращия 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:

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

V_{eyMx} = елуиращия обем за полистирол с молекулно тегло M_x

$V_{ey(10Mx)}$ = елуиращия 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,

Ve1, 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 пиковете, обемът на кюветката на детекторната клетка трябва да се поддържа възможно най-малък. Той не трябва да бъде по-голям от 10 µl, 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 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. Modem Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, 1991. Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography — GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, 1992. Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

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 тетрахидрофуран 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 μVs/ml)

R = реакцията на pMMA стандарта (в μVs)

C = концентрацията на pMMA стандарта (в mg/ml)

V = инжекторния обем (в ml), и

dn/dc = нарастването на рефрактивния индекс за pMMA в тетрахидрофуран (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 елуирал 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 стъкленицата (вижте A.6 Разтворимост във вода, метод на стъкленицата) 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 надробяване, 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 pH 2 и pH 9 се определя по същия начин, както описания по-горе за провеждането на изпитването при 20 °C. Стойностите за pH 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 NH_3.

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 (TOC) 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:

— TOC, използващ изваряване на персулфат или дихромат, за да се получи CO_2, 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 въглеводород. 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/неекстрахиралата 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 филтрата, 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. **ДАННИ**

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 ектрахируеми компоненти наистина са били екстрахирани. 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 екстрахирал 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 процедурите и условията на изпитването,

— описание на аналитичните методи и методите за детекция.

3.1.3. **Резултати**

— резултати за разтворимост/екстрахируемост в mg/1; 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,

— pH 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. **ПРЕПРАТКИ**

DIN 53733, 1976. Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

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 изпитваното 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 напълване 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 монтират 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 90º спрямо механично обработените повърхности. Вдлъбнатината 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 свръзка. 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-отдаленият 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 непропусклива 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 60º 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. Жицата 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. Жицата се загрява 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 окислители 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 (г)

Вещество (в)	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
Инертно вещество	
Вода:целулоза	(б)

(а) Средна стойност от сравнителни опити на различни лаборатории.
(б) Не се достига максималното налягане от 2070 kPa.
(в) Наситените разтвори се приготвят при 20 °C.
(г) 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.

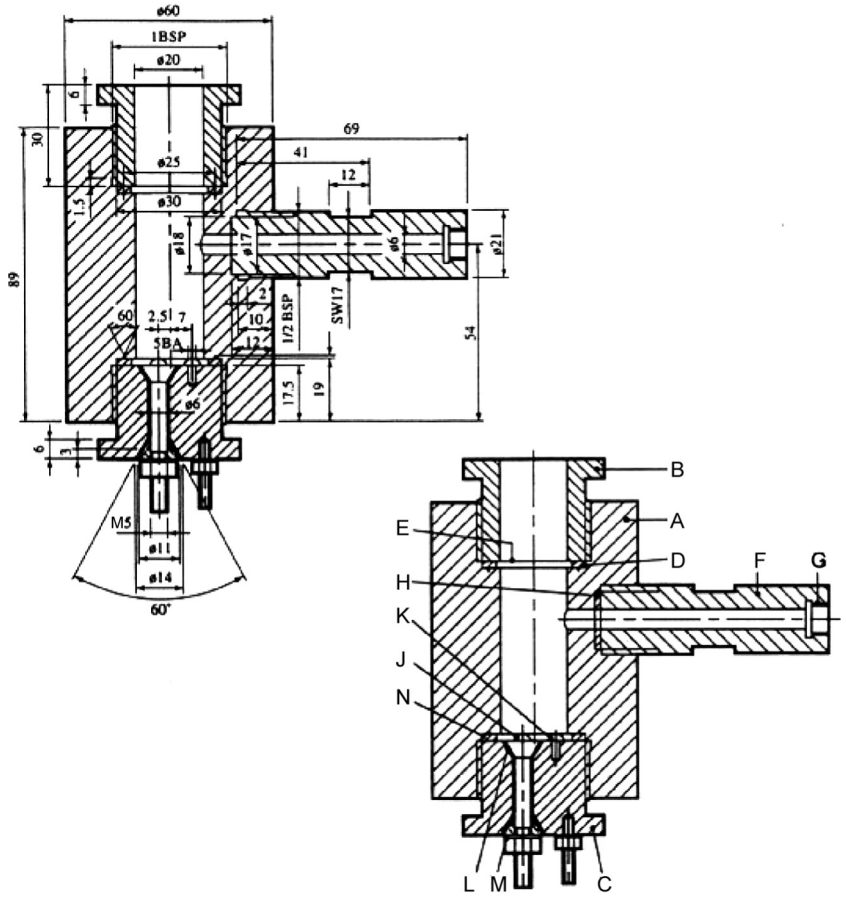
▼B

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

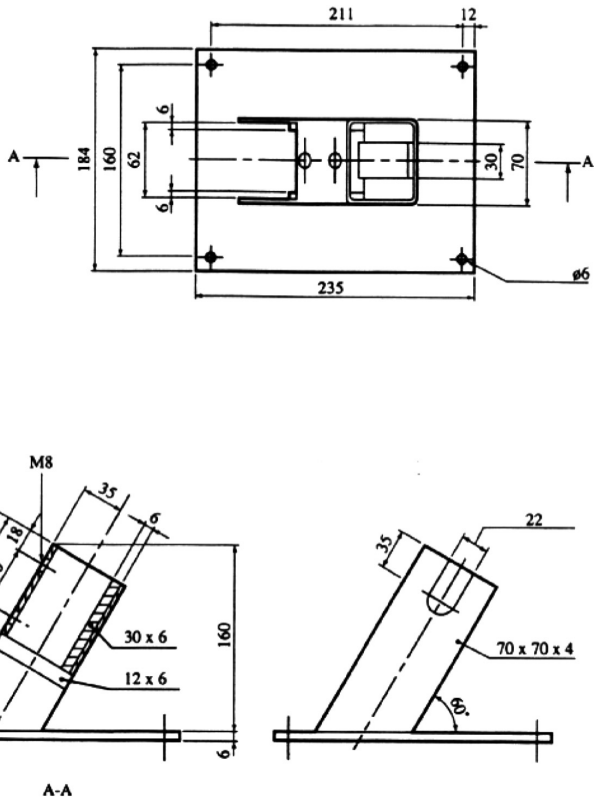
(Л) Стоманен конус

(М) Уплътнение на спираловидния канал

▼B

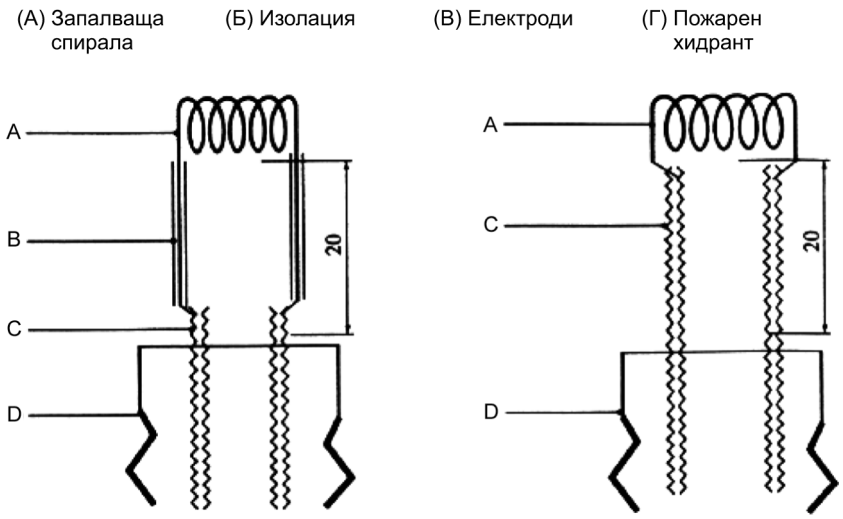
Фигура 2

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 (MMMF). Тъй като LWGMD на всички влакна попада с 95 % вероятност в 95-процентния доверителен интервал (LWGMD ± 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 междулабораторен опит (1, 2). Настоящият метод за измерване може да се използва за охарактеризиране на диаметъра на влакната на насипни материали или продукти, които съдържат MMMF, включително и огнеупорни керамични влакна (RCF), изкуствени стъкловлакна (MMVF), 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 MMMF, 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

Частица: 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 ядкова проба или лабораторна замба за вземането на ядкови 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 плъст 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 плъстта или ако са налични големи дължини от плъстта, 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 MPa. Материалът се размесва с шпатула и се пресова отново при 10 MPa, 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 °C.

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 подсигуряващ филтър MEC 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 ± 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 x 2 000.

1.5.3.3.2. Работа

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 0º, 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 допира 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 lnD) и стандартното отклонение (SD_{lnD}) на логаритъма с основа e на стойностите (lnD) на n диаметри на влакна (D).

$$\text{mean } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum (\ln D - \text{mean } \ln D)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Стандартното отклонение се дели на квадратния корен на броя измервания (n), за да се получи стандартната грешка (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

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.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mean } \ln D - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

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-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/-07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994 г.

▼M4

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

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоен на Указание за изпитване 123 на ОИСР (ОИСР 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 обърната 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 ОИСР 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 биоакумулация 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 уравновесяват 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 стъкленица, могат да бъдат намалени чрез предложения тук опит с бавно разбъркване. При опита с бавно разбъркване водата, 1-октанолът и изпитваното вещество се уравновесяват 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 pH 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 pH, 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 известни химичен състав и радиохимична чистота. В случай на индикатори за кратък полуживот следва да се прилагат корекции за разпадане. В случай на белязани изпитвани вещества следва да се използва метод за анализ, специфичен за съответния химикал, за да се гарантира, че измерената радиоактивност е пряко свързана с изпитваното вещество.

15. Прогнозен log P_{OW} може да се изчисли чрез използването на наличен в търговската мрежа софтуер за определяне на log P_{OW} или чрез използване на съотношението на разтворимостта в двата разтворителя.

16. Преди да се проведе опит с бавно разбъркване за определяне на P_{OW} следва да е налице следната информация за изпитваното вещество:

а) структурна формула;

б) подходящи методи за анализ за определяне на концентрацията на веществото във вода и в 1-октанол;

в) дисоциационна константа (константи) на вещества, които могат да съществуват в йонизирано състояние (Указание 112 на ОИСР) (9);

г) разтворимост във вода (10);

д) абиотична хидролиза (11);

е) готова биоразложимост (12);

ж) 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

$SR = S_{oct}/S_w$(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 нагряване най-малко за три часа при температура 400 °C.

20. И двата разтворителя се насищат взаимно преди опита чрез уравновесяването им в достатъчно голям съд. Това се постига чрез бавно разбъркване на двуфазовата система в продължение на два дни.

21. Избира се подходяща концентрация на изпитваното вещество и същото се разтваря в 1-октанол (наситен с вода). Коефициентът на разпределение 1-октанол/вода трябва да бъде определен в разредени разтвори в 1-октанол и вода. Поради това концентрацията на изпитваното вещество не бива да превишава 70 % от разтворимостта му с максимална концентрация от 0,1 mol/l във всяка фаза (1). Разтворите на 1-октанол, използвани в опита, не трябва да съдържат твърдо изпитвано вещество под форма на суспензия.

22. Подходящото количество изпитвано вещество се разтваря в 1-октанол (наситен с вода). Ако очакваната стойност на P_{OW} е по-висока от пет, следва да се вземат мерки разтворите на 1-октанол, използвани за опита, да не съдържат твърдо изпитвано вещество под форма на суспензия. За тази цел се използва следната процедура за химикали с очаквана стойност на $\log P_{OW} > 5$:

— изпитваното вещество се разтваря в 1-октанол (наситен с вода),

▼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 разредения изходен разтвор. Ако измерената концентрация съответства на разреждането, разреденият 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 нагрети 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 l 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 анализираните 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 ^{2}H, 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 разредени 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 слоят от 1-октанол да бъде достатъчно дебел (> 0,5 cm), за да може да бъде взета проба от фазата на 1-октанол без слоят 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 уравновесяване се преценява чрез извършване на опит с бавно разбъркване и периодично вземане на проби от 1-октанол и вода. Времевите 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 уравновесяване

39. Приема се, че равновесието е достигнато, когато след регресионен анализ на отношението на концентрациите 1-октанол/вода за период с четири времеви точки се получи наклон, който не се различава значително от нула на р-ниво 0,05. Минималното време за уравновесяване 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 уравновесяването за по-хидрофобни съединения да бъде удължено. За съединение с log P_{OW} 8,23 (декахлоробифенил) бяха достатъчни 144 часа за уравновесяване. 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. Оставя 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 стъкленицата трябва да се избягва във всички случаи; не бива да се допуска капки 1-octanol 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 уравновесяване, 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 слоят 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 разредена.

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:

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

където

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

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

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

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

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

$$var_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

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,

— pH на водната фаза и използваните буфери, когато pH е регулирано за молекули, които могат да съществуват в йонизирано състояние,

— брой на повторенията.

Резултати:

— повторяемост 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 A.8. „Коефициент на разпределение“ от настоящото приложение.

(3) Глава A.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 A.6. „Разтворимост във вода“ от настоящото приложение.

(11) Глава B.7. „Разграждане — абиотично разграждане: хидролиза като функция от pH“ от настоящото приложение.

(12) Глава B.4. „Определяне на пряката биологична разградимост“ — части II—VII (методи от A до E) от настоящото приложение.

(13) Глава A.4. „Налягане на парите“ от настоящото приложение.

(14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.

(15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.

(16) Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

(17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

(18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

(19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**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 × 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 H_2O 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

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

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

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

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

Надвишава 10 % дори в съд за уравновесяване 10 литра.

▼M4

Обобщение на необходимите обеми като функция на разтворимостта във вода и на log P_{OW}

Минимален необходим за фазата на H_2O обем за всяка концентрация на ГО (ml)

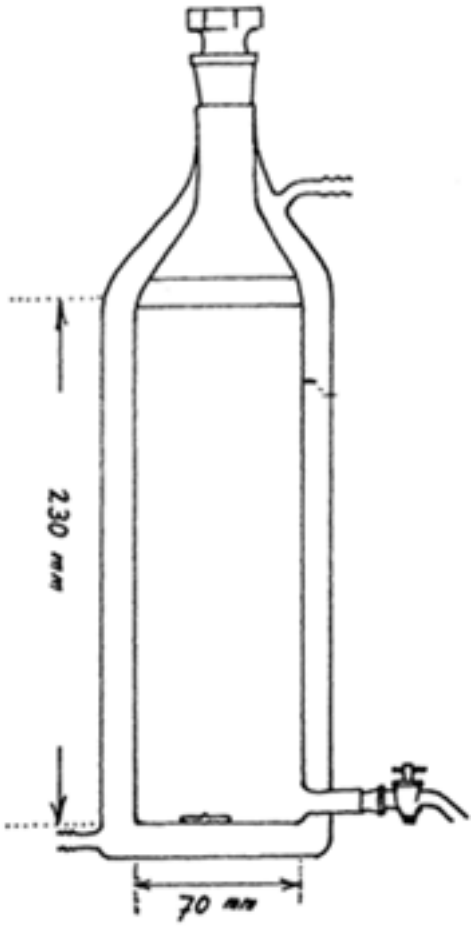
log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (microgram/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	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.					

Допълнение 2

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



▼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. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ: ОЧНО ДРАЗНЕЩО/КОРОЗИВНО ДЕЙСТВИЕ

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. МУТАГЕННОСТ — ТЕСТ *IN VITRO* ЗА ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ ПРИ БОЗАЙНИЦИ

Б.11. МУТАГЕННОСТ — ТЕСТ *IN VIVO* ЗА ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ В КОСТНИЯ МОЗЪК НА БОЗАЙНИЦИ

Б.12. МУТАГЕННОСТ — *IN VIVO* МИКРОЯДРЕН ТЕСТ НА ЕРИТРОЦИТИ ОТ БОЗАЙНИЦИ

Б.13/14. МУТАГЕННОСТ — БАКТЕРИИ ЗА ТЕСТВАНЕ НА ОБРАТНИ МУТАЦИИ

Б.15. ИЗПИТВАНЕ ЗА МУТАГЕННОСТ И ПРЕСЯВАЩО ИЗПИТВАНЕ ЗА КАНЦЕРОГЕННОСТ НА ГЕННИ МУТАЦИИ — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Б.16. МИТОТИЧНИ РЕКОМБИНАЦИИ — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Б.17. МУТАГЕННОСТ — *IN VITRO* ТЕСТ ЗА КЛЕТЪЧНИ ГЕННИ МУТАЦИИ ПРИ БОЗАЙНИЦИ

Б.18. УВРЕЖДАНЕ И РЕПАРАЦИЯ НА ДНК — НЕПЛАНИРАН СИНТЕЗ НА ДНК КЛЕТКИ ОТ БОЗАЙНИЦИ *(IN VITRO*)

Б.19. ИЗПИТВАНЕ *IN VITRO* ЗА ОБМЕНИ НА СЕСТРИНСКИ ХРОМАТИДИ

Б.20. ИЗПИТВАНЕ ЗА ПОЛОВО СВЪРЗАНА РЕЦЕСИВНА ЛЕТАЛНОСТ ПРИ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

▼**B**

Б.21.	ИЗПИТВАНИЯ *IN VITRO* ЗА ТРАНСФОРМАЦИИ В КЛЕТКИ ОТ БОЗАЙНИЦИ
Б.22.	ИЗПИТВАНЕ ЗА ДОМИНАНТНА ЛЕТАЛНОСТ ПРИ ГРИЗАЧИ
Б.23.	ТЕСТ ЗА СПЕРМАТОГОНИАЛНИ ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ ПРИ БОЗАЙНИЦИ
Б.24.	ИЗПИТВАНЕ ЗА ПЕТНА ПО КОЗИНАТА ПРИ МИШКИ
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.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

▼**B**

Б.41. *IN VITRO* 3T3 NRU ИЗПИТВАНЕ ЗА ФОТОТОКСИЧНОСТ

Б.42. КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛОКАЛНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ

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 ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ВЕЩЕСТВА С КОРОЗИВНО И ДРАЗНЕЩО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ ОЧИТЕ

Б.48. МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ С ИЗОЛИРАНИ ПТИЧИ ОЧИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВЕЩЕСТВА С КОРОЗИВНО И СИЛНО ДРАЗНЕЩО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ ОЧИТЕ

Б.49. ИЗПИТВАНЕ *IN VITRO* ЗА МИКРОЯДРА НА КЛЕТКИ ОТ БОЗАЙНИЦИ

Б.50. КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛОКАЛНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ: DA

Б.51. КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛОКАЛНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ: BRDU-ELISA

▼**M4**

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

▼B

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

Строгият контрол на условията на заобикалящата среда и техниката за добри грижи към животните са основни изисквания за тестовете върху токсичност.

i) *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° C ± 3° C при относителна влажност от 30 до 70 %; за зайците температурата следва да бъде 20 + 3° 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 мониторират, 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.

▼B

ii) *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 етикетиране 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 ОИСР 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 изпяло 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. Впоследствие 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 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 (IOMC).

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.)

LD_{50} (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 LD_{50} 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 поетапна 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 дотогава, 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 ± 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.

▼B

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.

▼B

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 оцелее, 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 оцелее. 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 възможни 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 изваденитe 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, физикохимични 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.

Заключения.

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 LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469—482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R. N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313—324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315—323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, 183—196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment N. 19.

▼B

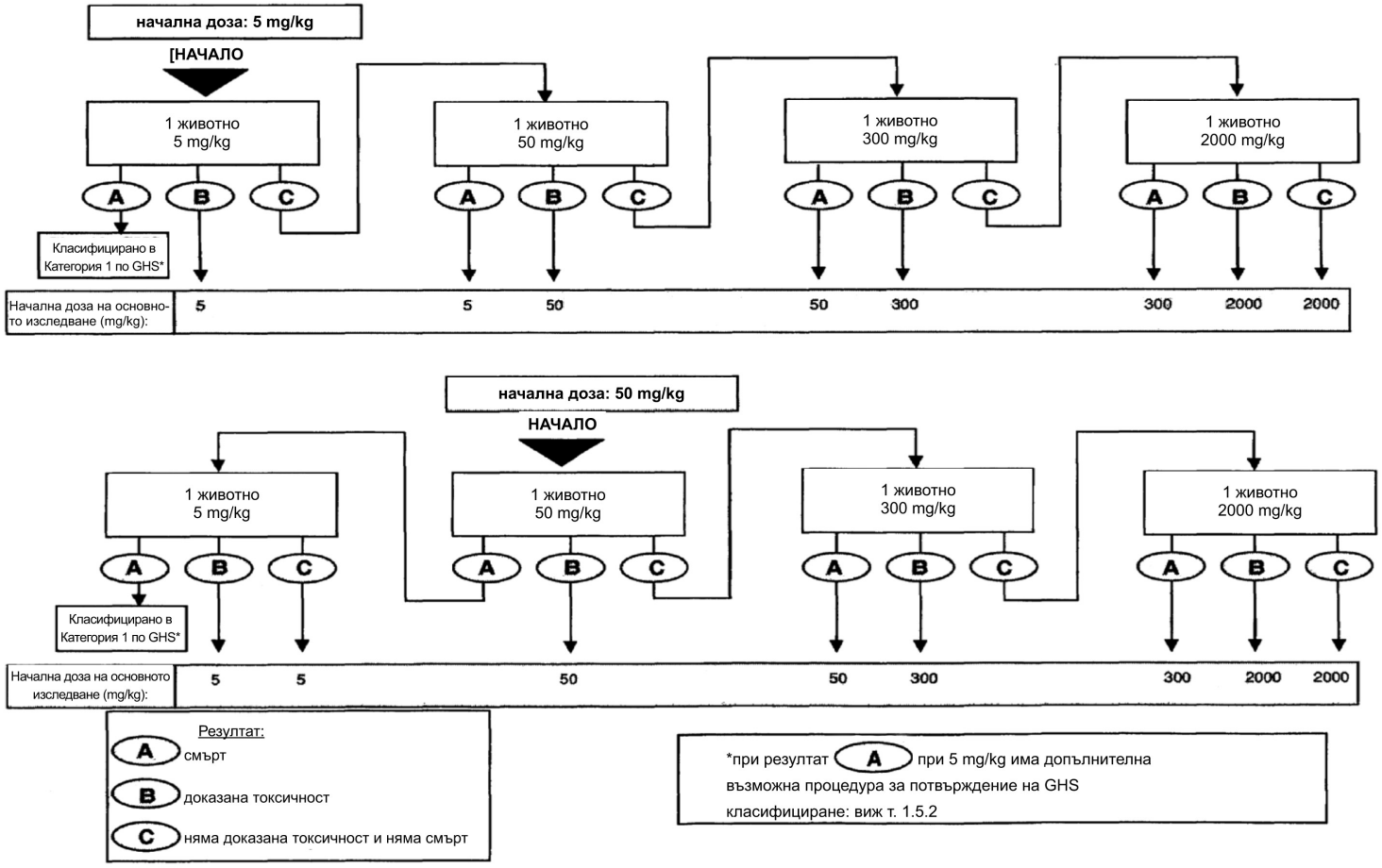
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-№-24-№-0,FF.html].

(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 LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223—231.

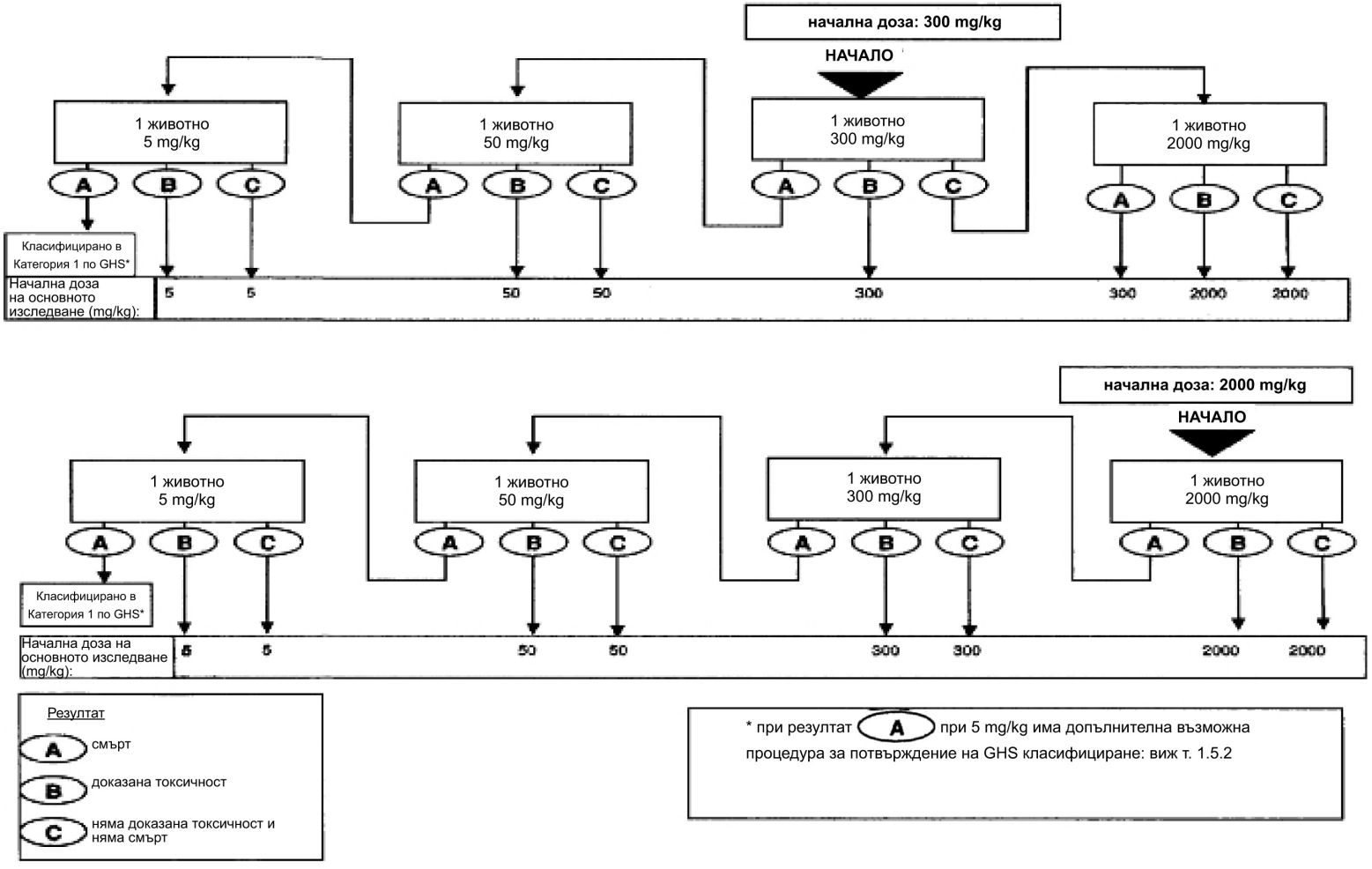
(11) Chan P. K and A. W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3 rd Edition. A. W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ГРАФИЧЕН АЛГОРИТЪМ ЗА ЗРИТЕЛНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ



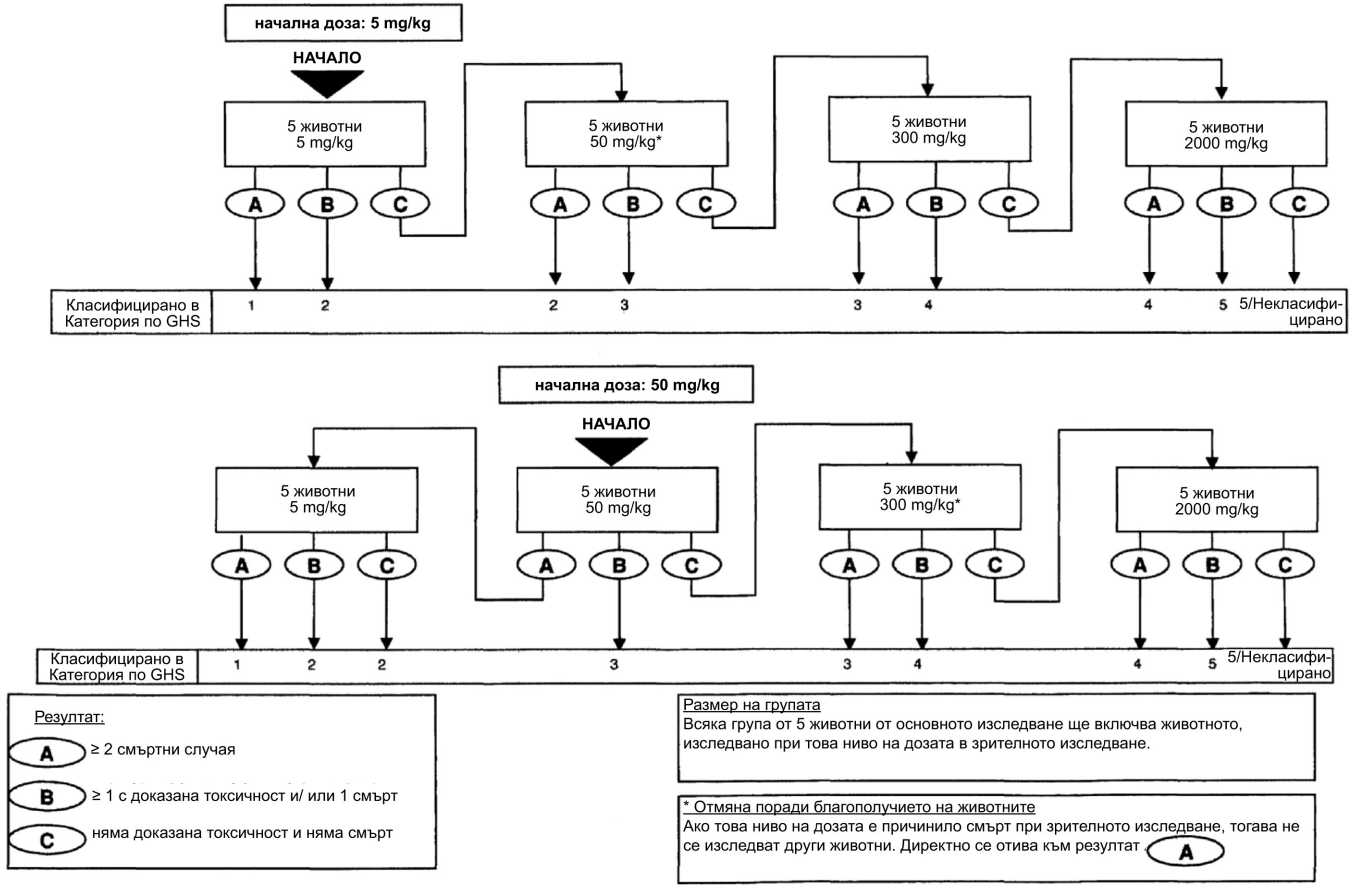
▼B


начална доза: 300 mg/kg
НАЧАЛО
1 животно
5 mg/kg
1 животно
50 mg/kg
1 животно
300 mg/kg
1 животно
2000 mg/kg
A
B
C
Класифицирано в
Категория 1 по GHS*
Начална доза
на основното
изследване (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
начална доза: 2000 mg/kg
НАЧАЛО
1 животно
5 mg/kg
1 животно
50 mg/kg
1 животно
300 mg/kg
1 животно
2000 mg/kg
Класифицирано в
Категория 1 по GHS*
Начална доза на
основното изследване
(mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Резултат
A
смърт
B
доказана токсичност
C
няма доказана токсичност и
няма смърт
* при резултат A при 5 mg/kg има допълнителна възможна
процедура за потвърждение на GHS класифициране: виж т. 1.5.2

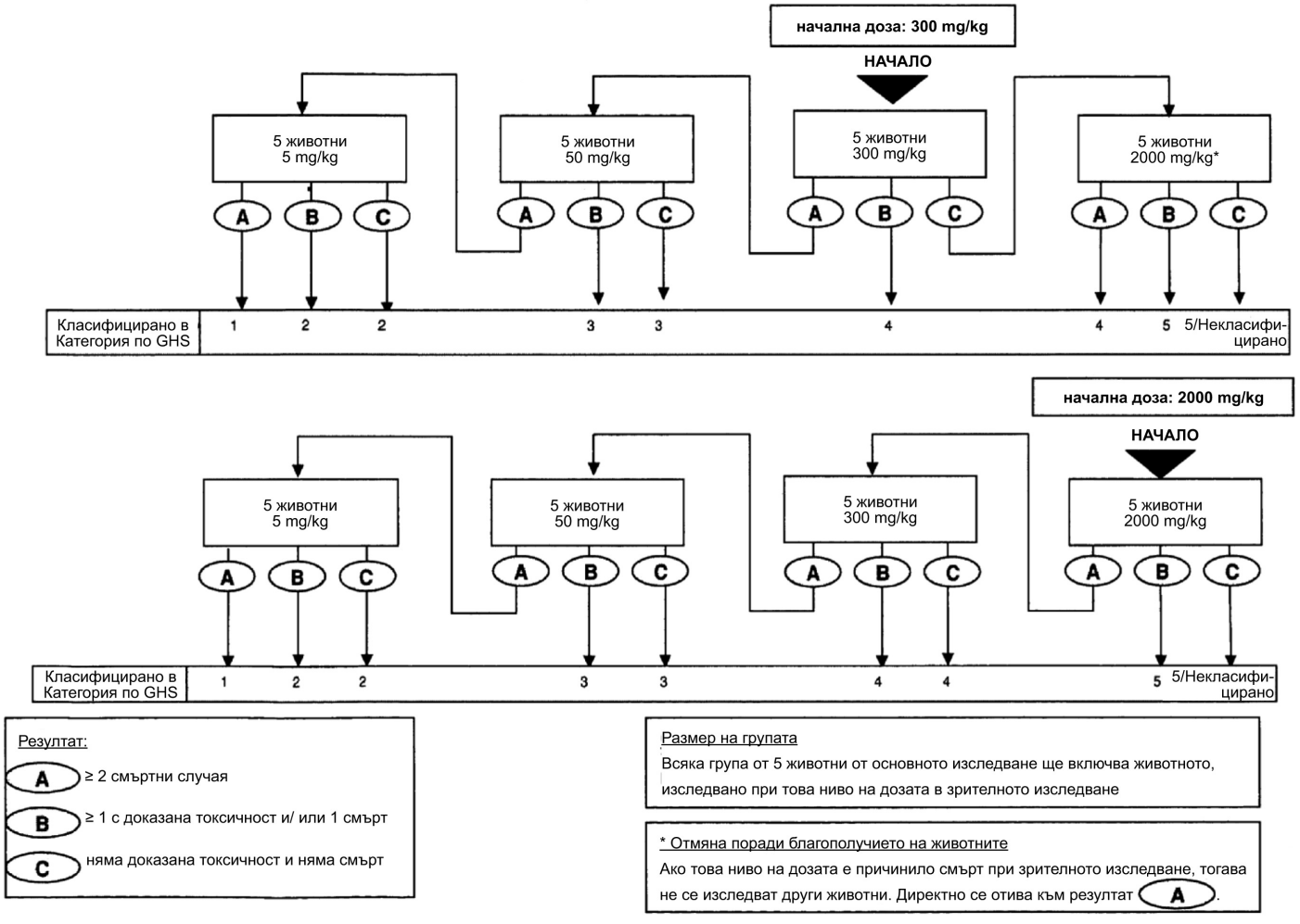
▼B

ПРИЛОЖЕНИЕ 2:

ГРАФИЧЕН АЛГОРИТЪМ ЗА ОСНОВНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ



▼B


начална доза: 300 mg/kg
НАЧАЛО
5 животни 5 mg/kg
5 животни 50 mg/kg
5 животни 300 mg/kg
5 животни 2000 mg/kg*
A B C
Класифицирано в Категория по GHS
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Некласифи-цирано
начална доза: 2000 mg/kg
НАЧАЛО
5 животни 5 mg/kg
5 животни 50 mg/kg
5 животни 300 mg/kg
5 животни 2000 mg/kg
A B C
Класифицирано в Категория по GHS
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Некласифи-цирано
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.

▼B

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

КРИТЕРИИ ЗА КЛАСИФИЦИРАНЕ НА ИЗПИТВАНО ВЕЩЕСТВО С ОЧАКВАНА СТОЙНОСТ НА LD_{50} НАД 2 000 MG/KG БЕЗ НЕОБХОДИМОСТОТ 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 LD_{50} 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 < LD_{50} < 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 LD_{50} 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

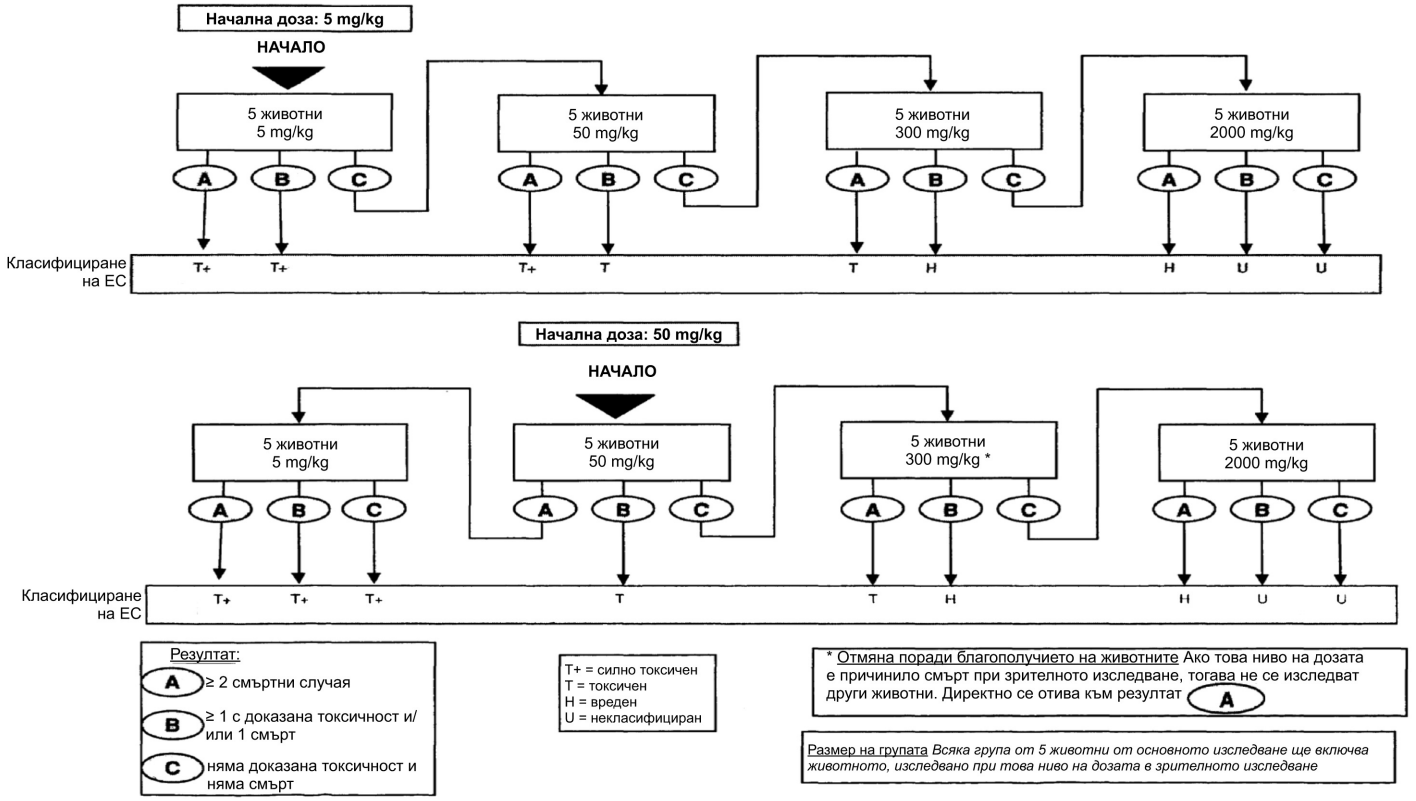
Правилата за вземане на решение, които са указани в следващата процедура, представена в приложение 2, включват доза с ниво 5 000 mg/kg. По този начин, когато при основно изследване се използва начална доза 5 000 mg/kg, резултат A (> 2 смъртни случая) налага изследване на втора група при 2 000 mg/kg; резултат B (доказана токсичност и/или < 1 смъртен случай) или C (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 C при 2 000 mg/kg; резултат A след прилагането на 5 000 mg/kg води до това веществото да бъде определено в категория 5 на GHS, а резултат B или C води до това веществото да не бъде класифицирано.

▼B

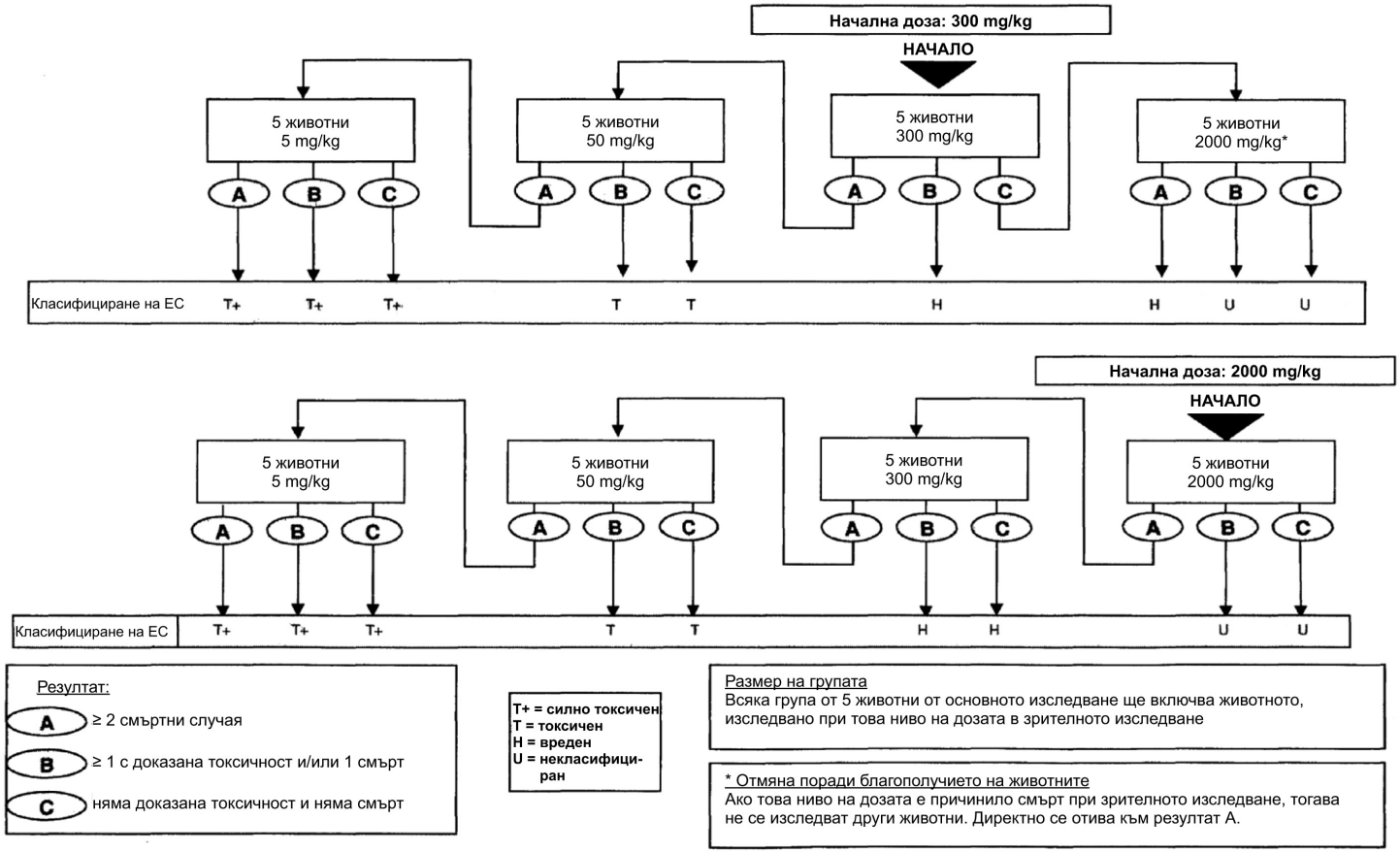
ПРИЛОЖЕНИЕ 4

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


Начална доза: 300 mg/kg
НАЧАЛО
5 животни
5 mg/kg
5 животни
50 mg/kg
5 животни
300 mg/kg
5 животни
2000 mg/kg*
A
B
C
Класифициране на ЕС
T+
T
H
U
Начална доза: 2000 mg/kg
НАЧАЛО
5 животни
5 mg/kg
5 животни
50 mg/kg
5 животни
300 mg/kg
5 животни
2000 mg/kg
Резултат:
A ≥ 2 смъртни случая
B ≥ 1 с доказана токсичност и/или 1 смърт
C няма доказана токсичност и няма смърт
T+ = силно токсичен
T = токсичен
H = вреден
U = некласифициран
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 А.

▼B

Б.1Б. **ОСТРА ОРАЛНА ТОКСИЧНОСТ — МЕТОД КЛАС ОСТРА ТОКСИЧНОСТ**

1. **МЕТОД**

Този метод за изпитване е еквивалентен на ОИСР 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 LD_{50} 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 LD_{50}, 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 LD_{50} 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 (IOMC).

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.)

LD_{50} (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 LD_{50} 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 LD_{50}.

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 LD_{50} 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 ± 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 въвеждана 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, слюноотделяне, 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 изваденте 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 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 следва да включва следната информация:

Изпитвано вещество:

— физична форма, чистота и, където е подходящо, физикохимични 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., Нцfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86

(2) Roll R., Riebschlflдger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizitдt von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336—341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559—610

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729—734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129—134

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method — An Alternative to the LD_{50} 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 LD_{50}, 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.

▼B

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ПРОЦЕДУРА, КОЯТО ТРЯБВА ДА БЪДЕ СЛЕДВАНА ЗА ВСЯКА ОТ НАЧАЛНИТЕДОЗИ

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

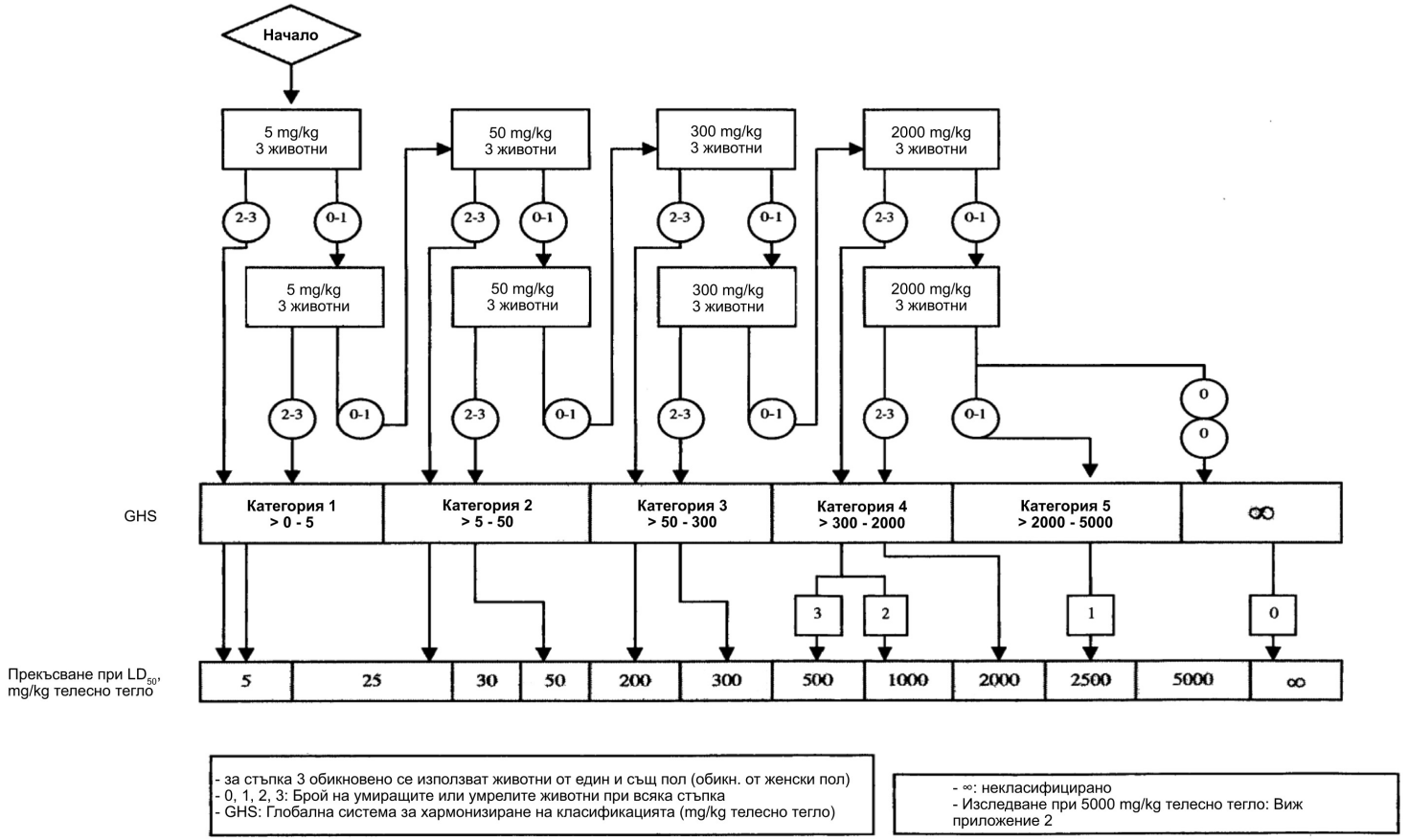
— Приложение 1в: началната доза е 300 mg/kg тт

— 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.

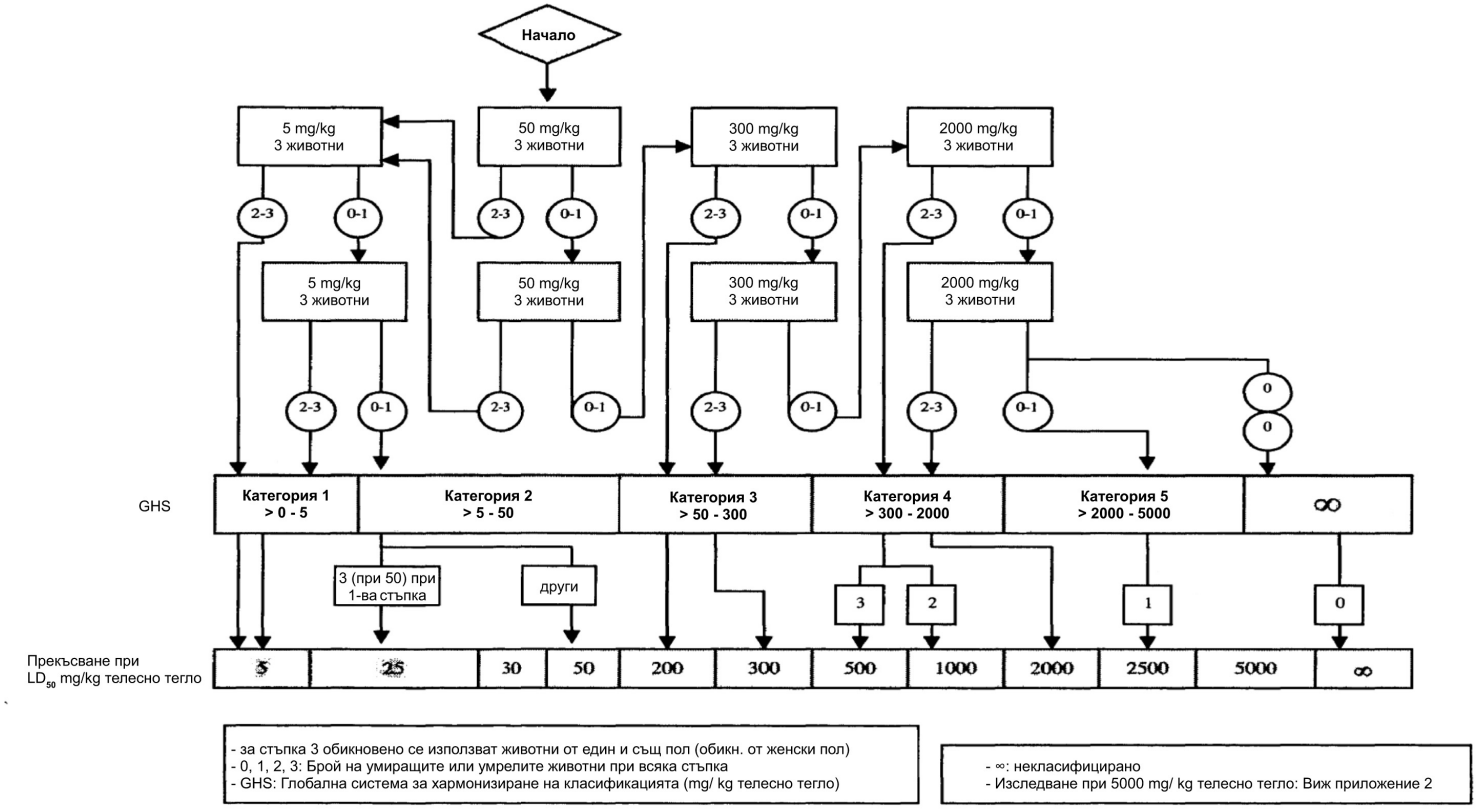
ПРИЛОЖЕНИЕ 1А

ПРОЦЕДУРА ЗА ИЗПИТВАНЕ С НАЧАЛНА ДОЗА 5 MG/KG ТЕЛЕСНО ТЕГЛО



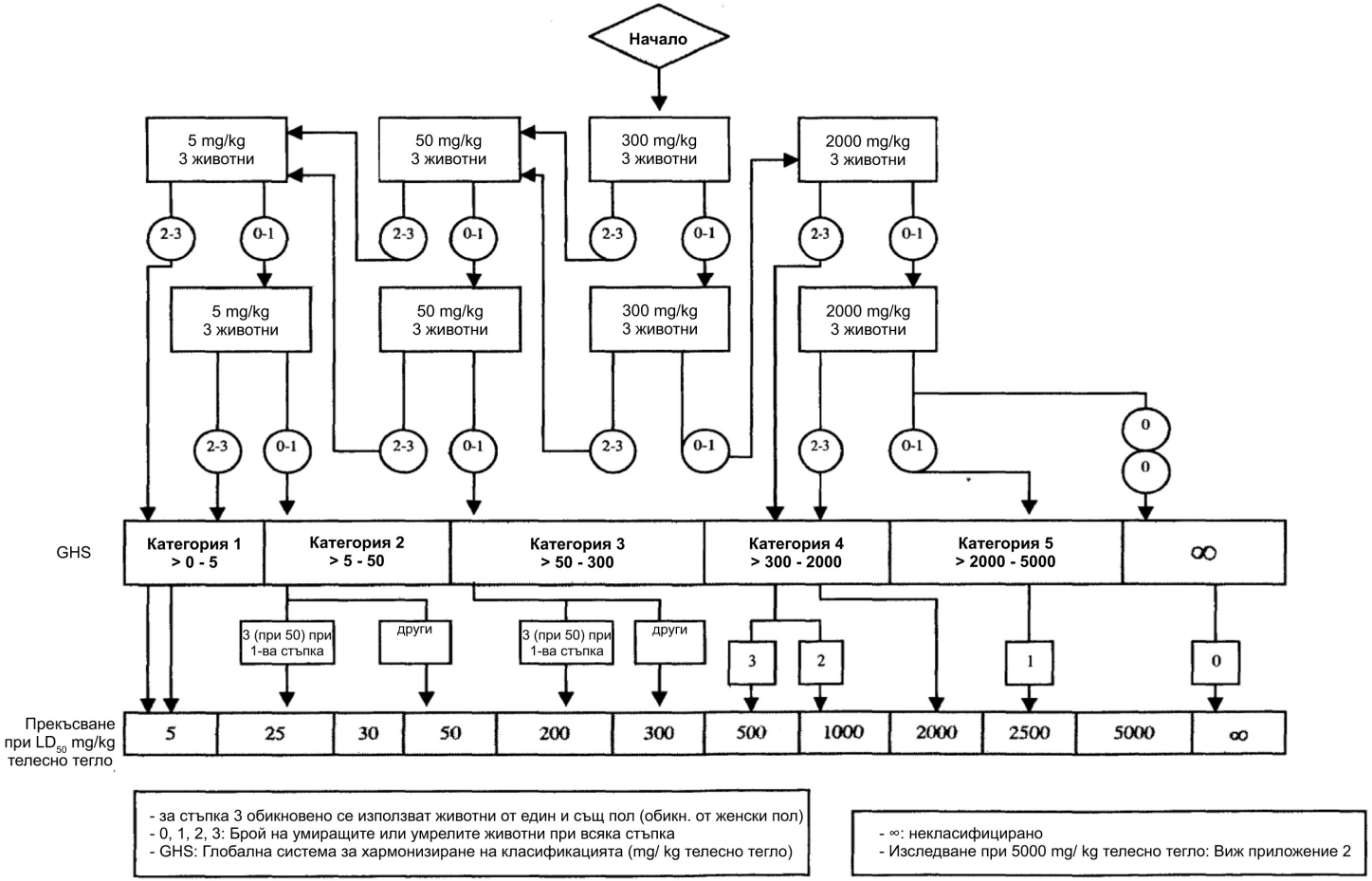
ПРИЛОЖЕНИЕ 1Б

ПРОЦЕДУРА ЗА ИЗПИТВАНЕ С НАЧАЛНА ДОЗА 50 MG/KG ТЕЛЕСНО ТЕГЛО



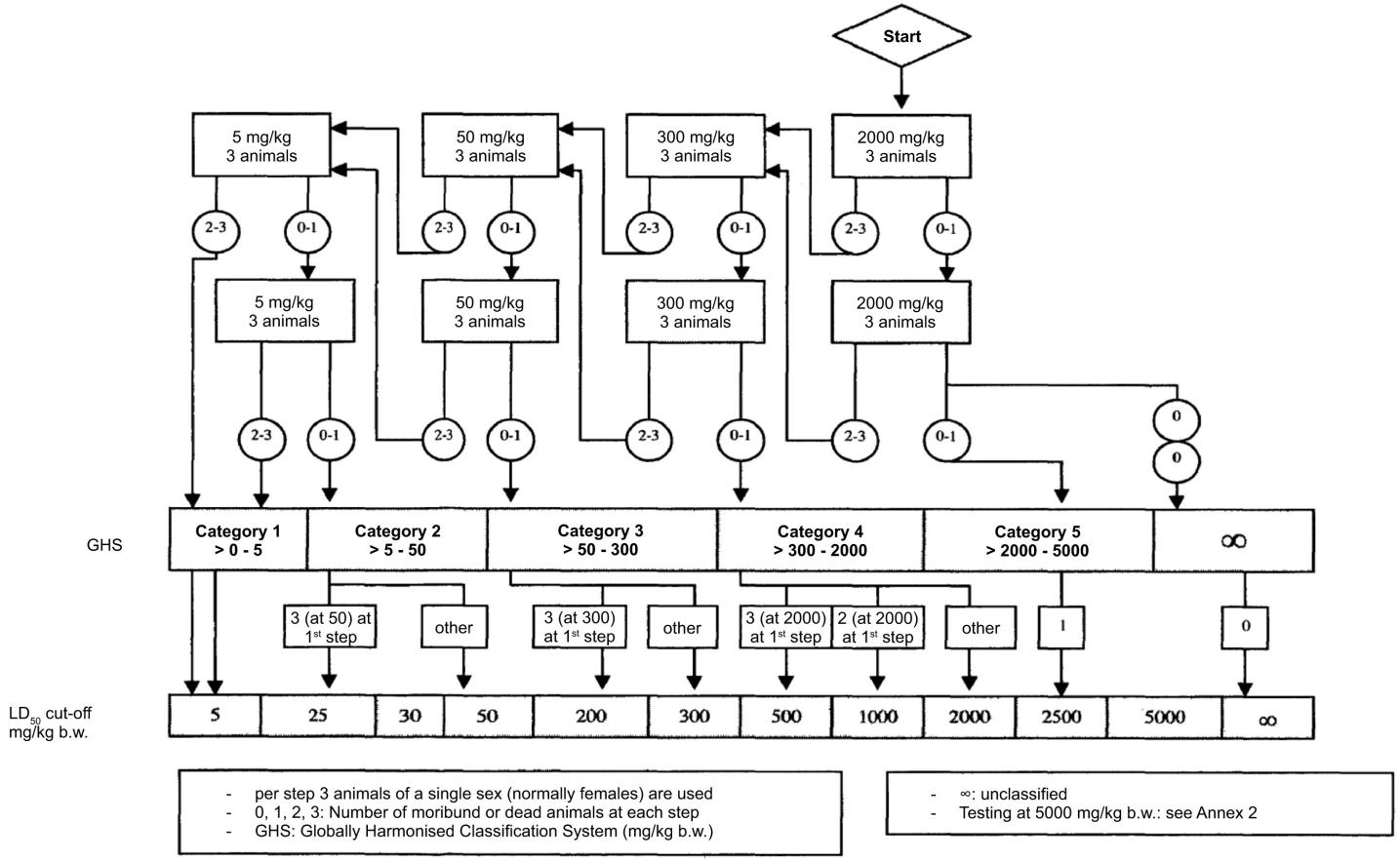
ПРИЛОЖЕНИЕ 1B

ПРОЦЕДУРА ЗА ИЗПИТВАНЕ С НАЧАЛНА ДОЗА 300 MG/KG ТЕЛЕСНО ТЕГЛО



ПРИЛОЖЕНИЕ 1Г

ПРОЦЕДУРА ЗА ИЗПИТВАНЕ С НАЧАЛНА ДОЗА 2 000 MG/KG ТЕЛЕСНО ТЕГЛО



▼B

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

КРИТЕРИИ ЗА КЛАСИФИЦИРАНЕ НА ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО С ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ НА LD_{50} 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 LD_{50} 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 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (категория 5 от GHS) в следните случаи:

а) ако е насочено към тази категория по някоя от схемите за изследване от приложения 1а—1г, основани на смъртни инциденти;

б) ако вече съществува достоверно доказателство, което показва, че LD_{50} 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

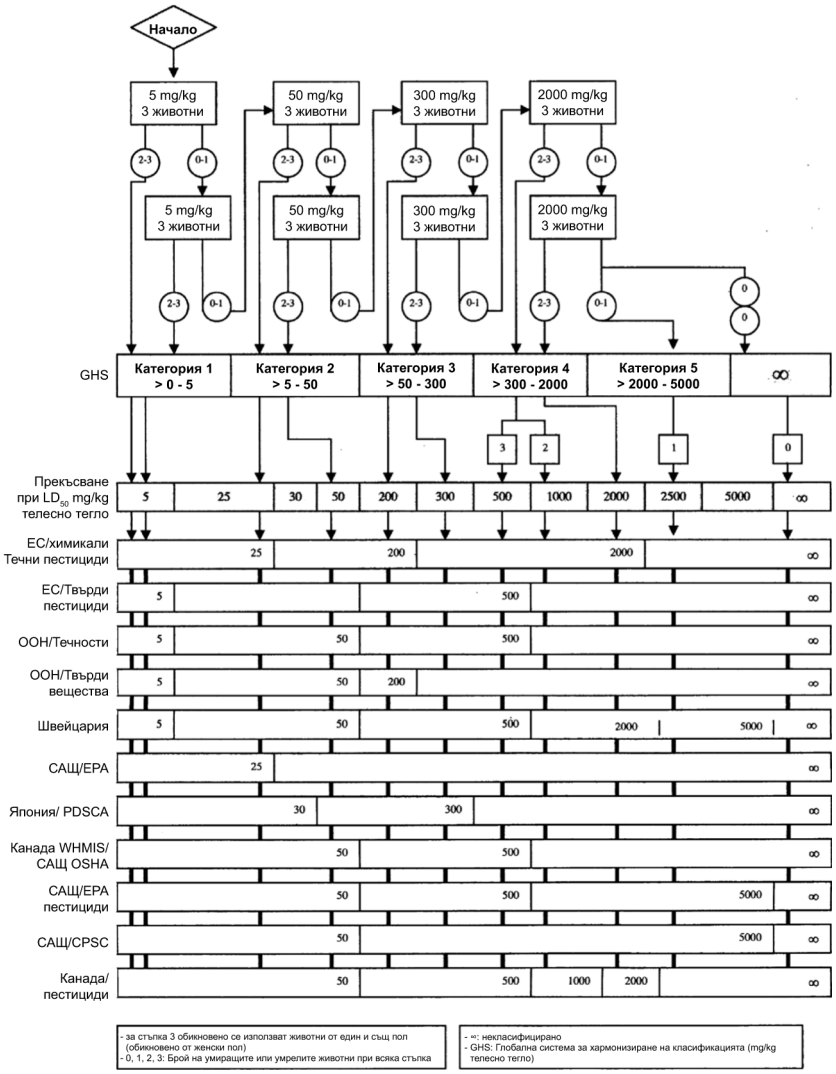
Признавайки необходимостта от запазване на хуманно отношение към животните, изследването на животни, попадащи в обхвата на категория 5 (5 000 mg/kg), не е препоръчително и следва да бъде разглеждано само когато има голяма вероятност резултатите от такова изследване да имат пряко практическо значение 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 LD_{50} да надвишава 5 000 mg/kg. Ако и двете животни умрат, тогава дозирането продължава при 2 000 mg/kg.

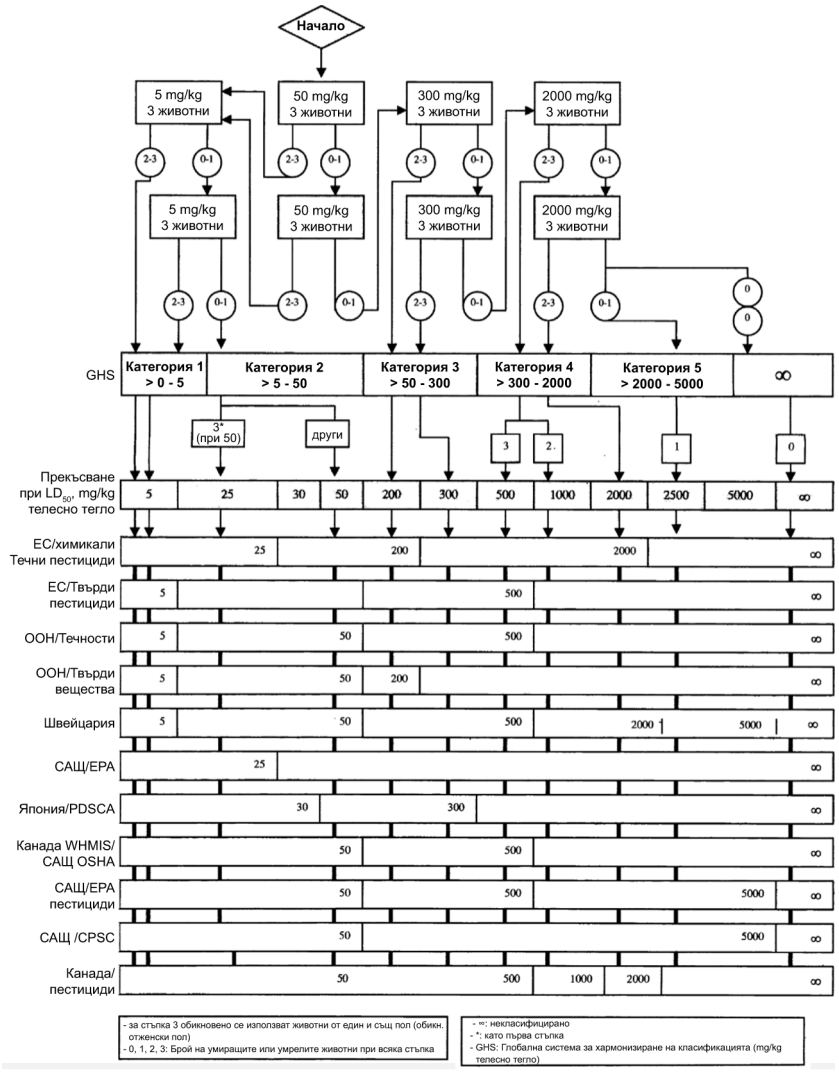
▼B

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

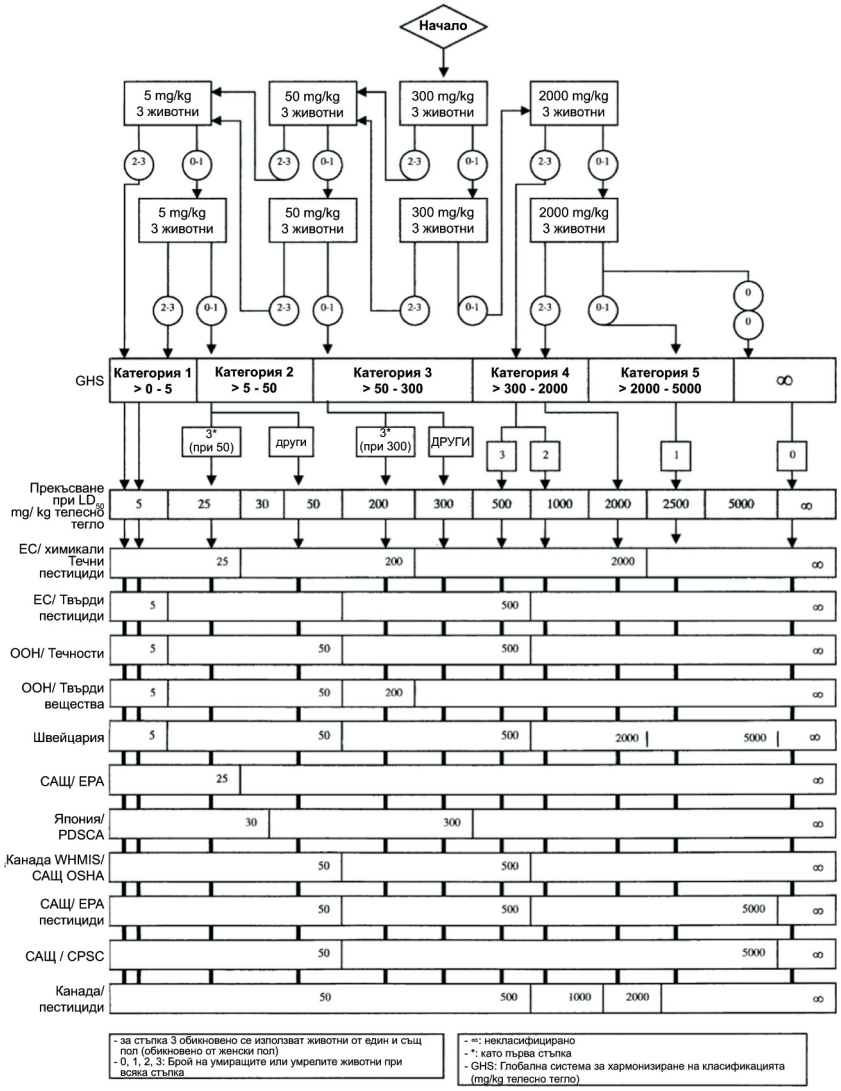
МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ Б.1б: Ръководство за класифициране съгласно схемата на ЕС за обхващане на преходния период до пълното прилагане на Глобалната система за хармонизиране на класификацията (GHS) (взето от препратка 8)



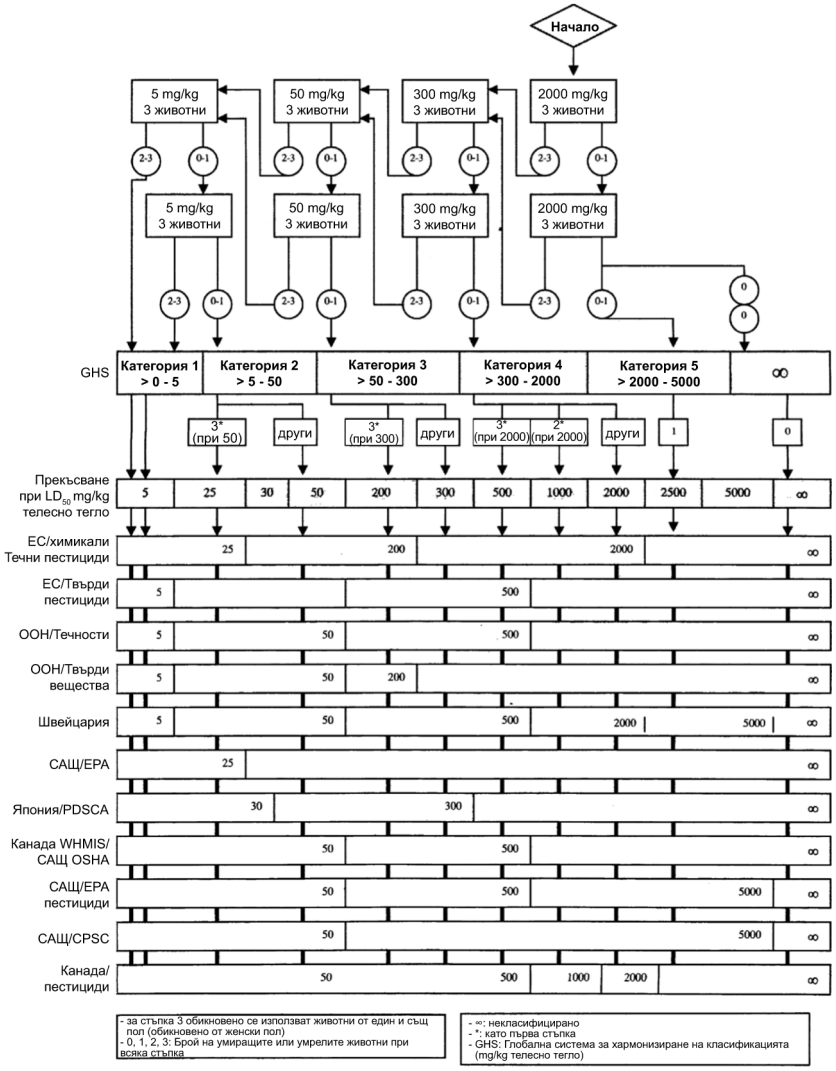
▼B


Начало
5 mg/kg 3 животни
50 mg/kg 3 животни
300 mg/kg 3 животни
2000 mg/kg 3 животни
2-3
0-1
0
GHS
Категория 1 > 0 - 5
Категория 2 > 5 - 50
Категория 3 > 50 - 300
Категория 4 > 300 - 2000
Категория 5 > 2000 - 5000
∞
3* (при 50)
други
Прекъсване при LD50, mg/kg телесно тегло
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
ЕС/химикали Течни пестициди
ЕС/Твърди пестициди
ООН/Течности
ООН/Твърди вещества
Швейцария
САЩ/EPA
Япония/PDSCA
Канада WHMIS/ САЩ OSHA
САЩ/EPA пестициди
САЩ /CPSC
Канада/ пестициди
- за стъпка 3 обикновено се използват животни от един и същ пол (обикн. отженски пол)
- 0, 1, 2, 3: Брой на умиращите или умрелите животни при всяка стъпка
- ∞: некласифицирано
- *: като първа стъпка
- GHS: Глобална система за хармонизиране на класификацията (mg/kg телесно тегло)

▼B


Начало
5 mg/kg 3 животни
50 mg/kg 3 животни
300 mg/kg 3 животни
2000 mg/kg 3 животни
2-3
0-1
0
GHS
Категория 1 > 0 - 5
Категория 2 > 5 - 50
Категория 3 > 50 - 300
Категория 4 > 300 - 2000
Категория 5 > 2000 - 5000
∞
3* (при 50)
други
3* (при 300)
ДРУГИ
3
2
1
0
Прекъсване при LD50 mg/ kg телесно тегло
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
∞
ЕС/ химикали Течни пестициди
ЕС/ Твърди пестициди
ООН/ Течности
ООН/ Твърди вещества
Швейцария
САЩ/ EPA
Япония/ PDSCA
Канада WHMIS/ САЩ OSHA
САЩ/ EPA пестициди
САЩ / CPSC
Канада/ пестициди
- за стъпка 3 обикновено се използват животни от един и същ пол (обикновено от женски пол)
- 0, 1, 2, 3: Брой на умиращите или умрелите животни при всяка стъпка
- ∞: некласифицирано
- *: като първа стъпка
- GHS: Глобална система за хармонизиране на класификацията (mg/kg телесно тегло)

▼B


Начало
5 mg/kg 3 животни
50 mg/kg 3 животни
300 mg/kg 3 животни
2000 mg/kg 3 животни
2-3
0-1
0
GHS
Категория 1 > 0 - 5
Категория 2 > 5 - 50
Категория 3 > 50 - 300
Категория 4 > 300 - 2000
Категория 5 > 2000 - 5000
∞
3* (при 50)
други
3* (при 300)
3* (при 2000)
2* (при 2000)
1
Прекъсване при LD50 mg/kg телесно тегло
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
ЕС/химикали Течни пестициди
ЕС/Твърди пестициди
ООН/Течности
ООН/Твърди вещества
Швейцария
САЩ/EPA
Япония/PDSCA
Канада WHMIS/ САЩ OSHA
САЩ/EPA пестициди
САЩ/CPSC
Канада/ пестициди
- за стъпка 3 обикновено се използват животни от един и същ пол (обикновено от женски пол)
- 0, 1, 2, 3: Брой на умиращите или умрелите животни при всяка стъпка
- ∞: некласифицирано
- *: като първа стъпка
- GHS: Глобална система за хармонизиране на класификацията (mg/kg телесно тегло)

▼M4

Б.2. ОСТРА ТОКСИЧНОСТ (ИНХАЛАТОРНА)

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоен на Указание за изпитване 403 на ОИСР (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 равностоен на преработеното TG 403) е разработен така, че да бъде по-гъвкав, да се намали използването на животните, както и да задоволи нуждата от регулиране. Преработеният метод за изпитване включва два вида изследвания: Традиционен протокол за LC_{50} и протокол за Концентрация × Време (C × t). Първични характеристики на настоящия метод за изпитване са способността да предостави взаимовръзка концентрация-отговор, вариращa от нелетален до летален изход, с цел извеждане на медианна летална концентрация (LC_{50}), нелетална прагова концентрация (напр. LC_{01}) и наклон на кривата, както и да идентифицира потенциална възприемчивост като функция от пола. Протоколът за Концентрация × Време следва да се използва, когато е налице специфична регулаторна или научна необходимост, която изисква изпитване на животни с различна продължителност, като например за целите на планирането на ответни действия при извънредни ситуации [например, за разработване на указателни стойности за равнищата на остра експозиция (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 етикетиране, 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 ОИСР TG 435 (7)), стойности на pH, 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. LC_{50}, LC_{01} 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 ($C \times t$), 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 ОИСР № 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. Принципите на техниките за експозиция само през носа и за експозиция на цялото тяло и техните специфични предимства и недостатъци са описани в GD 39 (2).

УСЛОВИЯ НА ЕКСПОЗИЦИЯ

Прилагане на концентрациите

13. Експозициите само през носа при плъхове могат да бъдат с произволна продължителност, най-много до 6 часа. Експозициите само през носа при мишки по принцип не трябва да надвишават 4 часа. Ако са необходими изследвания при по-голяма продължителност, трябва да се представи обосновка [вж. GD 39 (2)]. Животните, експонирани на аерозоли в камери за цялото тяло, следва да се настаняват поотделно, за да се предотврати поглъщането на изпитвания химикал в резултат от поддържане на външния вид на други индивиди в същата клетка. По време на експозицията не трябва да се дава храна. Вода може да се дава по време на експозиция на цялото тяло.

14. Животните се експонират на изпитвания химикал, който представлява газ, пари, аерозол или смес от тях. Агрегатното състояние, което трябва да бъде изпитано, зависи от физичните и химичните свойства на изпитвания химикал, избраната концентрация, и/или най-вероятната физична форма по време на манипулирането и употребата на изпитвания химикал. Хигроскопични и химически реактивоспособни изпитвани химикали следва да бъдат изпитвани в среда от сух въздух. Следва да се полагат грижи за избягване достигането на концентрации, при които може да бъде причинена експлозия.

▼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 случаи, при които системата за експозиция не може да осигури адекватна динамика на потока на атмосферата с изпитвания химикал. Съществуват предписани методологии, които могат да се използват за доказване, че в рамките на избраните работни условия не настъпва повторно инхалиране (2) (11). Концентрацията на кислород следва да бъде не по-малко от 19 %, а концентрацията на въглероден диоксид не трябва да превишава 1 %. Ако има основание да се смята, че тези стандарти не могат да бъдат спазени, концентрациите на кислорода и на въглеродния диоксид следва да се измерват.

▼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 непостижимо (например при изпитване на смеси на основата на вода), или да не може да бъде измерено поради въздействие на изпитвания химикал върху метода за изпитване.

Изпитван химикал: Номинална концентрация

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

Изпитван химикал: Действителна концентрация

21. Действителната концентрация е концентрацията на изпитвания химикал в зоната на дишане на животните в дадена инхалационна камера. Действителни концентрации могат да бъдат получени чрез специфични методи (например чрез пряко пробовземане, свързани с адсорбция или с химична реакция методи и последващо аналитично охарактеризиране) или чрез неспецифични методи като гравиметричен анализ с филтруване. Използването на гравиметричен анализ е приемливо само за еднокомпонентни прахови аерозоли или за аерозоли от ниско летливи течности и следва да бъде подпомогнато от подходящо специфично за изпитвания химикал охарактеризиране чрез предварително изследване. Концентрацията на многокомпонентни прахови аерозоли също може да бъде определяна чрез гравиметричен анализ. Това обаче изисква аналитични данни, които доказват, че съставът на намиращия се във въздуха материал е подобен на този на изходния материал. Ако тази информация не е налична, може да е необходимо извършване на анализ на изпитвания химикал (в идеалния случай в състоянието, в което е разтворен във въздуха), повтарящо се на редовни интервали по време на изследването. За агенти в аерозолна форма, които могат да се изпаряват или да сублимират, следва да се покаже, че всички фази са събрани по избрания метод. Целевата, номиналната и действителната концентрации следва да бъдат посочени в доклада от изследването, но в статистически анализи за изчисляване на стойностите на леталната концентрация се използват само действителните концентрации.

22. По възможност следва да се използва една партида от изпитвания химикал, като изпитваната проба следва да се съхранява при условия, при които се поддържат нейната чистота, хомогенност и устойчивост. Преди началото на изследването следва да се извърши охарактеризиране на изпитвания химикал, включително неговата чистота и, ако е технически осъществимо, идентичността, както и количествата на определените замърсители и примеси. Това може да бъде доказано от, но не се ограничава до, следните данни: време на задържане и относителна площ на пика, получена чрез масспектрометричен 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 скорост на въздушния поток или ниска концентрация, през целия период

▼M4

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 ± 10 % за газовете и парите или ± 20 % за течните или твърдите аерозоли. Времето за уравновесяване на камерата (t_{95}) следва да се изчислява и записва. Продължителността на дадена експозиция обхваща времето, за което се генерира изпитваният химикал, като при това се взема предвид изискваният период за постигане на t_{95}. Указания за оценката на t_{95} могат да бъдат намерени в GD 39 (2).

24. При много сложни смеси, съставени от газове/пари и аерозоли (например атмосфера след горене и изпитвани химикали, отделяни от целеви продукти/оборудване за крайна употреба), всяка фаза може да реагира по различен начин в инхалационната камера и следователно от всяка фаза (газ/пари и аерозол) следва да бъде избрано най-малко едно вещество (аналит), служещо като показател, като обичайно това е основното активно вещество в сместа. Когато изпитваният химикал е смес, аналитичната концентрация следва да се докладва за сместа, а не само за активното вещество или за компонента (аналита). Допълнителна информация относно действителните концентрации може да бъде намерена в GD 39 (2).

Изпитван химикал: Разпределение според размера на частиците

25. Разпределението според размера на частиците на аерозоли трябва да се определи най-малко два пъти по време на всяка 4-часова експозиция, като се използва каскаден импактор или алтернативен инструмент, като например спектрометър за определяне на размера на аеродинамични частици. Ако може да бъде доказана равностойността на резултатите, получени от каскадния импактор и от алтернативния инструмент, тогава алтернативният инструмент може да бъде използван по време на цялото изследване. Успоредно с основния инструмент следва да бъде използвано второ устройство, като например гравиметричен филтър или поглътител с 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 × t. И двата протокола могат да включват зрително изследване, основно изследване, и/или изпитване при пределна концентрация (традиционен протокол), или изпитване при максимална пределна концентрация (C × 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 зрителни 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 изпитани 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 експонира 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 зрително 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 експонира на изпитван химикал на няколко равнища на концентрация и с множество различни продължителности. Всички изпитвания се извършват в камера за експозиция само през носа (камерите за експозиция на цялото тяло не са практични за настоящия протокол). Настоящият протокол е илюстриран в технологична диаграма в допълнение 1. Чрез симулационен анализ е установено, че и при традиционния протокол, и при протокола C × t могат да бъдат получени устойчиви стойности за LC_{50}, но по принцип протоколът C × t е по-ефективен при получаване на устойчиви стойности за LC_{01} и LC_{10} (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 сбъдване 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 половете. Тези животни трябва да бъдат експонирани с единична продължителност, обичайно 240 минути. Възможността за генериране на подходяща атмосфера за изпитване следва да бъде оценена по време на предварителни технически изпитвания без животни. По принцип не е необходимо извършване на 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 × 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 × 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 × 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 × 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 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.

▼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 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.

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 носителя (ако е различен от вода),

— данни за минали периоди или паралелни данни, доказващи че носителят не пречи на резултата от изследването;

Инхалационна камера

— описание на инхалационната камера, включително размери и обем,

— източник и описание на оборудването, използвано за експозицията на животните, както и за генерирането на атмосферата,

— оборудване за измерване на температурата, относителната влажност, размера на частиците и действителната концентрация,

— източник на въздух и обработка на доставяния/извличания въздух и система, използвана за кондициониране,

— използвани методи за калибриране на оборудването за гарантиране на хомогенна атмосфера за изпитване,

— разлика в налягането (положителна или отрицателна),

— отвори за експозиция за всяка камера (експозиция само през носа); местоположение на животните в системата (експозиция на цялото тяло),

— хомогенност/устойчивост във времето на атмосферата за изпитване,

— разположение на датчиците за температура и относителна влажност и пробовземане на атмосферата за изпитване в камерата,

— скорости на въздушния поток, скорост на въздушния поток при отвор за експозиция (експозиция само през носа) или брой животни на камера (експозиция на цялото тяло),

— информация за оборудването, използвано за измерване на кислород и въглероден диоксид, ако е приложимо,

— време, необходимо за достигане на уравновесяване на инхалационната камера (t_{95}),

— брой изменения на обема на час,

— измервателни прибори (ако е приложимо);

Данни за експозицията

— обосновка за избора на целева концентрация в основното изследване,

— номинални концентрации (обща маса на изпитвания химикал, генерирана в инхалационната камера, разделена на преминалия през камерата обем въздух),

— действителни концентрации на изпитвания химикал, взети от зоната на дишане на животните; за смеси, които произвеждат хетерогенни физични форми (газове, пари, аерозоли), всяка от тези форми може да бъде анализирана отделно,

▼M4

— всички концентрации във въздуха следва да се докладват в единици за масова концентрация (напр. mg/l, mg/m^3 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. LC_{50}, LD_{01}), включително 95 %-ен доверителен интервал и наклон на крива (ако се предоставят от метода за оценка),

— статистическо отношение, включително оценка за експонент n (протокол C × t). Следва да бъде предоставено наименованието на използвания статистически софтуер;

▼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 ОИСР 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, 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) 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 × 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 зрително 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 сбъдване 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**

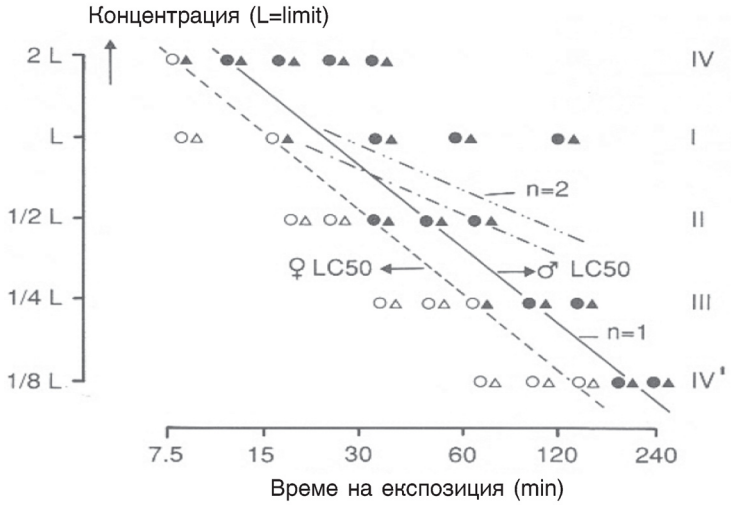
7. Концентрацията в камерата трябва да се измерва често за определяне на средно претеглена по време концентрация за всяка продължителност на експозицията. Когато е възможно, времето на смъртта на всяко животно (а не продължителността на експозицията) следва да се използва в статистическия анализ.

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 × 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

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

Прекъсната 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 √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 ([г]) (1/4 L) с малко по-продължителни експозиции (разположени с отстояние във времето, определено от геометрична прогресия с частно √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 ([г]) (1/8 L) с малко по-продължителни експозиции (разположени с отстояние във времето, определено от геометрична прогресия с частно √2; вж. фигура 1).

↓ или

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

([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 избирани 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 (√2; вж. препратка 11) около времето съгласно равнището на минималната смъртоносна доза (време x 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 ([д]) (2 L) с малко по-краткотрайни експозиции (разположени с отстояние във времето, определено от геометрична прогресия с частно √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 LC_{50} може да бъде изчислена за даден период от време (например 4 часа, 1 час, 30 минути или всякакъв друг период от време в рамките на диапазона на периодите от време на изпитване), при P = 5 (50 % отговор). Отбележете, че правилото на Хабер се прилага само при n = 1. Стойността на LC_{01} може да бъде изчислена при P = 2,67.

([д]) 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 (√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 ± 20 % от съответната средна стойност за всеки от двата пола.

▼B

1.6.2.2. *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 LD_{50}.

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, докогато 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 LD_{50} 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 апликации 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 ºC (±3 ºC). 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 хранене 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 животни 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 настъпилото 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 обобщят 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 увреждания. 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 алопеция (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. pH, 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.

▼B

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 пялата 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 поетапен 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 pH) 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 pH (pH $\geq$ 11,5 или 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 pH, 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 разредено 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 третират 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.

▼B

Фигура

СТРАТЕГИЯ ЗА ИЗПИТВАНЕ И ОЦЕНКА НА ДРАЗНЕЩО/КОРОЗИВНОДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ КОЖАТА

	Activity	Finding	Conclusion
1	Existing human and/or animal data showing effects on skin or mucous membranes	Corrosive	Apical endpoint; considered corrosive. No testing is needed.
		Irritating	Apical endpoint; considered to be an irritant. No testing is needed.
		Not corrosive/not irritating	Apical endpoint; considered not corrosive or irritating. No testing required.
	↓ *No information available, or available information is not conclusive* ↓		
2	Perform SAR evaluation for skin corrosion/irritation	Predict severe damage to skin	Considered corrosive. No testing is needed.
		Predict irritation to skin	Considered an irritant. No testing is needed.
	↓ *No predictions can be made, or predictions are not conclusive or negative* ↓		
3	Measure pH (consider buffering capacity, if relevant)	pH ≤ 2 or ≥ 11.5 (with high buffering capacity, if relevant)	Assume corrosivity. No testing is needed.
	↓ *2 < pH < 11.5, or pH ≤ 2.0 or ≥ 11.5 with low/no buffering capacity, if relevant* ↓		
4	Evaluate systemic toxicity data via dermal route (1)	Very toxic	No further testing is needed.
		Not corrosive or irritating when tested to limit dose of 2000 mg/kg body weight or higher, using rabbits	Assume not corrosive or irritating. No further testing is needed.
	↓ *Such information is not available or is non-conclusive* ↓		
5	Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin corrosion	Corrosive response	Assume corrosivity *in vivo*. No further testing is needed.
	↓ *Substance is not corrosive* ↓		
6	Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin irritation	Irritant response	Assume irritancy *in vivo*. No further testing is needed.
	↓ *Validated in vitro or ex vivo testing methods for skin irritation are not yet available or substance is not an irritant* ↓		
7	Perform initial *in vivo* rabbit test using one animal	Severe damage to skin	Considered corrosive. No further testing is needed.
	↓ *No severe damage* ↓		
8	Perform confirmatory test using one or two additional animals	Corrosive or irritating	Considered corrosive or irritating. No further testing is needed
		Not corrosive or irritating	Considered not corrosive or irritating. No further testing needed

(1) can be considered before Steps 2 and 3.

▼B

Б.5. **ОСТРА ТОКСИЧНОСТ: ОЧНО ДРАЗНЕЩО/КОРОЗИВНО ДЕЙСТВИЕ**

1. **МЕТОД**

Този метод е еквивалентен на OECD TG 405 (2002)

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

При подготовката на този осъвременен метод специално внимание е отделено на възможностите за усъвършенстване на метода посредством оценка на пялата съществуваща информация за изпитваното вещество с оглед избягване на ненужно изпитване върху лабораторни животни. В този метод се препоръчва, преди да се пристъпи към *in vivo* изпитването за оценка на острото корозивно/дразнещо действие върху очите, да се извърши анализ на съществуващите данни за химичното вещество (1), които имат отношение към тези ефекти. 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 утвърдени *in vitro* изпитвания и е изложена като приложение към този метод. Също така се препоръчва, преди да се вземе решение за провеждане на *in vivo* изпитване за очно дразнещо/корозивно действие, да се проведе *in vivo* изпитване за оценка на кожното дразнещо/корозивно действие, въз основа на което може да се предвиди корозивният ефект върху очите.

В интерес както на научната стойност на проучването, така и на хуманното отношение към лабораторните животни е да не се взима решение за провеждане на *in vivo* изпитване, преди да бъдат анализирани и оценени всички налични данни във връзка с потенциалното корозивно/дразнещо действие на веществото върху очите. Тук се включват данни от съществуващи проучвания върху хора и/или лабораторни животни, данни за корозивно/дразнещо действие на едно или повече вещества с подобен химичен строеж или смеси от такива вещества, данни за висока киселинност или алкалност (4)(5), както и резултати от валидирани и утвърдени *in vitro* или *ex vivo* методи за оценка на дразнещо/корозивно действие върху кожата (6) (6а). Проучванията могат да бъдат извършени преди анализа на съществуващите данни или в резултат от този анализ.

За някои вещества анализът може да покаже необходимост от извършване на *in vivo* изпитване за оценка на потенциалното дразнещо/корозивно действие върху очите. Във всички тези случаи, преди да се вземе решение за провеждане на това изпитване, се препоръчва да се извърши *in vivo* изпитване на дермалните ефекти на веществото и оценка на резултатите от него съгласно метод Б.4 (7). Прилагането на анализа на съществуващите данни и стратегията за последователно изпитване следва да доведе до намаляване на необходимостта от извършване на *in vivo* изпитвания за очно корозивно/-дразнещо действие на веществата, за които съществуват достатъчно събрани данни от други проучвания. *In vivo* изпитване за оценка на очното корозивно/дразнещо действие може да се проведе, когато потенциалното очно корозивно/дразнещо действие не може да се оцени чрез прилагане на стратегията за последователно изпитване дори след извършването на *in vivo* изпитване за кожно дразнещо/корозивно действие.

▼B

В приложението към този метод е представена препоръчителна стратегия за последователно изпитване, която включва прилагането на валидирани *in vitro* или *ex vivo* методи за оценка на корозивно/дразнещо действие. Стратегията е разработена и единодушно препоръчана от участниците в семинар на OECD (8) и е приета като препоръчителна стратегия за изпитване в рамките на Глобалната система за хармонизиране на класификацията на химични вещества (GSH) (9). Препоръчва се тази стратегия за изпитване да се приложи, преди да се проведе *in vivo* изпитване. За нови вещества стратегията представлява препоръчителният подход за поетапно изпитване с цел получаване на достоверни научни данни за корозивно/дразнещо действие. За съществуващи вещества с недостатъчно данни за кожно и очно корозивно/дразнещо действие стратегията следва да се приложи, за да се получат липсващите данни. Използването на друга стратегия или процедура за изпитване или решението да не се прилага поетапният подход за изпитване следва да бъдат обосновани.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Очно дразнене е предизвикването на промени в окото след прилагане на изпитваното вещество върху предната очна повърхност, като промените се възстановяват напълно до 21-вия ден след третирането.

Корозивно действие върху очите е предизвикването на увреждане на тъканите на окото или сериозно увреждане на зрението вследствие прилагането на изпитваното вещество върху предната очна повърхност, като увреждането не се възстановява напълно до 21-вия ден след третирането.

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Изпитваното вещество се прилага еднократно върху едно от очите на опитното животно, а окото, което не е третирано, служи като контрола. През определени интервали от време се отчита и оценява степента на дразнещо/корозивно действие върху конюнктивата, роговицата и ириса. Други ефекти върху очите, както и неблагоприятни 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 се отчете дали наблюдаваните ефекти са обратими или не.

Животните, които показват трайни признаци на тежък стрес и/или болка в който и да е момент от изпитването, следва да бъдат умъртвени по хуманен начин и наблюдаваните 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 се намират в терминално състояние, са посочени в препратка (10)

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

1.4.1. **Подготовка на *in vivo* изпитването**

1.4.1.1. *Избор на вида опитни животни*

Предпочитаните 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*

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 предшестващо увреждане на роговицата, не следва да се използват.

▼B

1.4.1.3. *Условия на отглеждане и хранене*

Животните следва да бъдат разпределени в отделни клетки. В помещението, в което се намират зайците, следва да се поддържа температура 20 ºC (± 3 ºC). Стойностите на относителната влажност следва да не са по-ниски от 30 % и е желателно да не превишават 70 % освен по време на почистване на помещението. Целта е 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.

1.4.2. **Процедура на изпитването**

1.4.2.1. *Прилагане на изпитваното вещество*

Изпитваното вещество 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 може цялото поставено количество от веществото да се задържи в контакт с окото. Другото око не се третира и служи за контрола.

1.4.2.2. *Промивка*

Очите на опитните животни не следва да се промиват в продължение най-малко на 24 часа след прилагане на веществото, освен в случаите, когато веществото е в твърдо агрегатно състояние (виж точка 1.4.2.3.2) 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 допълнителна група животни за изследване влиянието на промивката не се препоръчва, освен ако не е достатъчно обосновано от научна гледна точка. Когато е необходимо използването на допълнителна група, тя следва да включва два заека. Условията за извършване на промивката следва да се документират внимателно, включително дата и час, състав и температура на разтвора за промиване и използвано количество от него, продължителност и скорост на промиването.

1.4.2.3. *Дози*

1.4.2.3.1. *Изпитване на течности*

Когато се изпитват течни вещества, третирането се извършва с количество от 0,1 ml. Вещества, които се употребяват под формата на спрей, следва да не бъдат прилагани директно върху окото чрез пръскане. В този случай част от течността следва да се изпръска и да се събере в контейнер, след което от нея се взема необходимото количество от 0,1 ml и се поставя в окото.

1.4.2.3.2. *Изпитване на твърди вещества*

Когато се изпитват твърди, пастообразни вещества и вещества, съставени от дребни частици, се прилага количество с обем 0,1 ml или маса не повече от 100 mg. Материалът, който се изпитва, следва да бъде стрит до фин прах. Обемът на прахообразното твърдо вещество следва да бъде измерен след леко уплътняване, например чрез почукване върху съда, в който се извършва измерването. Когато твърдото вещество не се е отстранило от окото по естествен път при първото отчитане на наблюдаваните промени (един час след третирането), окото може да се изплакне с физиологичен разтвор или дестилирана вода.

▼B

1.4.2.3.3. *Изпитване на аерозоли*

При всички вещества, които се прилагат като спрей (спрей с помпа или аерозол), се препоръчва част от течността да се изпръска в контейнер и от нея да се вземе количеството, необходимо за третиране на окото. Изключение се прави само за вещества в аерозолни флакони под налягане, които не могат да се съберат по този начин, поради това че се изпаряват. В тези случаи окото следва да се придържа отворено и изпитваното вещество се поставя директно върху предната му повърхност с едно изпръскване в продължение на около една секунда. Флаконът се държи пред окото на разстояние 10 cm. Разстоянието може да варира в зависимост от налягането на аерозола и неговия състав. Изпръскването под налягане следва да се извърши внимателно, за да не се увреди окото. В някои случаи може да бъде необходимо да се оцени потенциалът за „механично“ увреждане на окото от налягането на аерозола.

Оценка на дозата от аерозола, с която е третирано окото, може да бъде направена чрез следната процедура: веществото се напръсква върху тегловна хартия през отвор с размерите на окото на заека, поставен непосредствено пред хартията. Чрез разликата в теглото на хартията преди и след напръскването се определя приблизително количеството, което би попаднало върху окото. За летливи вещества вместо тегловна хартия може да се използва контейнер. Изпръсканото в него количество се определя чрез претегляне на контейнера преди и след изпразването му.

1.4.2.4. *Първоначално изпитване (in vivo изпитване за оценка на очно дразнещо/корозивно действие с използване на едно опитно животно)*

В съответствие със стратегията за последователно изпитване (вж. приложение 1) се препоръчва *in vivo* изпитването да се извърши първоначално върху едно опитно животно.

Когато това изпитване се проведе съгласно описаната процедура и резултатите показват, че веществото може да прояви корозивно или изразено дразнещо действие върху очите, не следва да се извършва по-нататъшно изпитване за оценка на очното дразнещо/корозивно действие.

1.4.2.5. *Местна упойка*

Необходимостта от използване на местни анестетици се преценява конкретно за всеки отделен случай. Когато анализът на съществуващите данни показва, че изпитваното вещество може да причини болка или при първоначалното изпитване се появява болка, преди третирането може да се приложи местен анестетик. Видът, концентрацията и дозата на анестетика следва да се подберат внимателно, така че употребата му да не доведе до промяна в реакцията към изпитваното вещество. Контролното око се третира с анестетика по същия начин.

1.4.2.6. *Потвърдително изпитване (in vivo изпитване за оценка на очно дразнещо действие с използване на допълнителни опитни животни).*

Когато при първоначалното изпитване не се наблюдава корозивен ефект, дразнещият ефект или негативният резултат следва да се потвърдят, като се третират най-много две допълнителни животни. Ако при първоначалното изпитване се установява силно изразено дразнещо действие и при потвърдителното изпитване се очаква силно изразен (необратим) ефект, се препоръчва потвърдителното изпитване да се извърши чрез последователно третиране (върху едно животно и след това при необходимост — върху още едно животно) вместо едновременно върху двете допълнителни животни. Когато при второто третирано животно се наблюдава корозивен или силно изразен дразнещ ефект, изпитването се прекратява. При поява на слаб или умерен дразнещ ефект може да се наложи използването на допълнителни опитни животни, за да се потвърдят тези резултати.

▼B

1.4.2.7. *Период на наблюдение*

Продължителността на периода на наблюдение следва да бъде достатъчна за цялостната оценка на степента и обратимостта на наблюдаваните ефекти. Въпреки това изпитването следва да се прекрати във всеки момент, когато опитните животни покажат трайни признаци на силна болка или стрес (9). Обикновено за да се установи дали ефектите са обратими, животните следва да се наблюдават в продължение на 21 дни след прилагането на веществото. Ако преди края на 21-дневния период се установи, че промените са обратими, изпитването се прекратява в момента, когато това е установено.

1.4.2.7.1. *Клинично наблюдение и оценка на очните реакции*

Очите се преглеждат на 1-вия, 24-ия, 48-ия и 72-рия час след прилагането на изпитваното вещество. Наблюдението не следва да продължава по-дълго от необходимото за получаване на достатъчно ясна и пълна информация. Животните, които показват трайни признаци на силна болка или стрес, следва да бъдат умъртвени незабавно по хуманен начин и тези ефекти да се вземат под внимание при оценката на веществото. Опитните животни със следните очни увреждания, настъпили след третирането, следва да бъдат умъртвени по хуманен начин: перфорация на роговицата или язви, засягащи значителна част от роговицата, включително стафилома; кръв в предната камера на окото; помътняване на роговицата от четвърта степен, коетс персистира за 48 часа; отсъствие на реакция на светлината (промени в ириса от втора степен), което персистира за 72 часа; язви на конюнктивата; некроза на конюнктивата или мигателните ципи; влажна некроза. Умъртвяването се налага, защото тези лезии най-често са необратими.

Опитните животни, при които не се развиват очни лезии, следва да бъдат умъртвени не по-рано от 3 дни след третирането. Опитни животни с леко до умерено изразени лезии следва да се наблюдават, докато лезиите отзвучат или в продължение на 21 дни, след което изпитването се прекратява. Наблюдението следва да се извърши на 7-ия, 14-ия и 21-вия ден след третирането, за да се прецени състоянието на получените лезии и тяхната обратимост или необратимост.

При всяко наблюдение следва да се отчита степента на очните реакции (за конюнктива, роговица и ирис) (таблица 1). Всички други очни лезии (например панус, пигментиране) или неблагоприятни системни ефекти също следва да се опишат.

Прегледът на очните реакции 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.

Оценката и степенуването на очните промени е субективен процес. За да се постигне съответствие в оценките при класифицирането на очните промени и да се подпомогнат лабораториите, в които се провеждат изпитвания, и лицата, които наблюдават животните и оценяват намерените промени, персоналът, извършващ наблюдението, следва да се обучи добре да прилага класификационната скала.

2. **ДАННИ**

2.2. ОЦЕНКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Баловата оценка на очното дразнене следва да се разглежда заедно с вида, тежестта и обратимостта или необратимостта на настъпилите лезии. Индивидуалната балова оценка не е единственият критерий за определяне на дразнещите свойства на изпитваното вещество, той като се оценяват и други ефекти на веществото. Вместо това индивидуалният бал следва да се разглежда като стойност, която има съдържание само когато е подкрепена от пълното описание и оценка на всички наблюдения.

▼B

3. **ДОКЛАДВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

3.1. ОТЧЕТ ЗА ИЗПИТВАНЕТО

Отчетът за изпитването следва да включва следната информация:

Обосновка на извършеното *in vivo* изпитване: резултати от анализа на съществуващите данни от предишни изпитвания, включително резултатите от прилагането на стратегията за последователно изпитване:

— описание на съществените данни от предишни изпитвания;

— данни, получени при всяка стъпка от стратегията за изпитване;

— описание на извършените *in vitro* изпитвания, включително подробно представяне на процедурите за изпитване и резултатите, получени при прилагане на изпитваните и референтните химични вещества;

— описание на проведеното *in vivo* изпитване за оценка на кожно дразнещо/корозивно действие и на получените резултати;

— 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. pH, летливост, разтворимост, стабилност, химична реакция с вода);

— при изпитване на смеси следва да се представят данни за качествения състав на сместа и процентното съдържание на компонентите ѝ;

— когато се използва местен анестетик, за него се представят данни за идентичност, чистота, вид, доза, възможност за взаимодействие с изпитваното вещество.

Носител:

— химично идентифициране, концентрация (когато е необходимо), използван обем;

— обосновка за избора на носителя.

Опитни животни:

— вид/порода, обосновка за използване на други животински видове/породи освен зайци албиноси;

— възраст на животните в началото на проучването;

— брой на животните от всеки пол в опитните 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.

Резултати:

— описание на методите за изследване на очния статус, използвани при характеризирането и степенуването на очните промени във всеки момент на отчитане (напр. използване на ръчна шпалт-лампа, биомикроскоп, флуоресцеин и др.);

▼B

— представяне в табличен вид на данните за проявите на дразнещо/корозивно действие за всяко животно във всички моменти на отчитане до отстраняването на животното от изпитването;

— описание в разказна форма на вида и степента на наблюдаваните прояви на дразнещо/корозивно действие;

— описание на всички други очни лезии (например васкуларизация, образуване на панус, адхезии, пигментиране);

— описание на неблагоприятни локални ефекти освен очните лезии, както и на неблагоприятни системни ефекти и хистопатологични наблюдения, ако такива са налице.

Обсъждане на резултатите.

3.2. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Екстраполацията на резултатите от проучванията на очното дразнене върху лабораторни животни е валидна само в ограничена степен. В много случаи зайците албиноси са почувствителни от хората към вещества с очно дразнещо или корозивно действие.

При интерпретацията на данните следва внимателно да се прецени и изключи възможността дразненето да е предизвикано вторично вследствие на инфекция.

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) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C. Dossou, K. G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K. C., Hill, R. N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem.Toxicol 35, 159—164.

(3) Worth A. P. and Fentem J. H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161—177.

(4) Young, J. R., How, M. J., Walker, A. P., Worth W. M. H.(1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19—26.

(5) Neun, D. J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227—231.

(6) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Edsaile, D. J., Holzhutter, H. G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp.483—524.

(6a) Testing Method B.40. Skin Corrosion.

(7) Testing method B.4. Acute toxicity: dermal irritation/corrosion.

(8) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22—24 January 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

▼B

(9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(10) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment №.19 (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

▼B

Таблица 1

СКАЛА НА ОЧНИТЕ УВРЕЖДАНИЯ

Роговица

Помътняване: степен на плътност (отчитането се извършва за участъка с най-плътно помътняване) (*)	
Отсъствие на улцерация или помътняване	0
Разпръснати или дифузни зони на помътняване (изключва се лекото замъгляване на нормалния блясък); детайлите на ириса са ясно различими	1
Ясно различима полупрозрачна зона; детайлите на ириса са леко замъглени	2
Зона със седефен цвят; детайлите на ириса не се забелязват; големината на зеницата се определя трудно	3
Непрозрачна роговица; ирисът не се различава през помътнената роговица	4

Максимален бал: 4

vide

(*) Зоната на помътняване на роговицата следва да бъде отбелязана.

Ирис

Без промени	0
Забележимо увеличени гънки, конгестия, оток, умерена перикорнеална хиперемия; ирисът реагира на светлина (вялата реакция се смята за признак на увреждане)	1
Кръвоизлив, разрушаване на нормалната структура, което е видимо макроскопски, или липса на реакция на светлина	2

Максимален бал: 2

Конюнктиви

Еритем (отнася се за палпебралната и булбарната конюнктива, като се изключват роговицата и ирисът)	
Нормални кръвоносни съдове	0
Хиперемия на някои кръвоносни съдове	1
Дифузно кървавочервено оцветяване; отделните кръвоносни съдове са трудно различими	2
Дифузно тъмночервено оцветяване	3

Максимален бал: 3

Хемоза

Подуване (отнася се за конюнктивата на клепачите и/или мигателните ципи)	
Липсва подуване	0
Наличие на подуване, забелязва се известна разлика спрямо нормалното състояние	1
Ясно изразено подуване с частично обръщане на клепачите	2
Подуване със затворени приблизително наполовина клепачи	3
Подуване със затворени повече от наполовина клепачи	4

Максимален бал: 4

▼B

ПРИЛОЖЕНИЕ

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. Преди да се пристъпи към *in vivo* изпитване, следва да се оцени цялата съществуваща информация по отношение на дразнещия/корозивния потенциал на дадено химично вещество за очите. Възможно е вече да съществуват достатъчно данни, въз основа на които веществото може да се класифицира по отношение на очното 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 ще се сведе 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 очното дразнещо и корозивно действие на химичното вещество, за да се прецени дали да се проведат други проучвания освен *in vivo* изпитвания върху очите, 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 очите. Стратегията за изпитване, изложена в настоящото приложение, е разработена на семинар на OECD (1). По-късно тя 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 B.5, тя представлява препоръчителният подход за оценка на дразнещия и корозивния ефект върху очите. Този подход съответства в най-висока степен на критериите за добра практика и етика при *in vivo* изпитванията за оценка на очното 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 очното дразнещо/корозивно действие на химичните вещества и поетапен подход за получаване на необходимите данни за веществата, които досега не са изследвани или за които са необходими допълнителни проучвания. В стратегията се включва първоначалното извършване на валидирани и утвърдени *in vitro* или *ex vivo* изпитвания и след това на изпитването за оценка на кожно корозивно/-дразнещо действие (метод B.4) при определени условия (3)(4).

ОПИСАНИЕ НА СТРАТЕГИЯТА ЗА ПОСЛЕДОВАТЕЛНО ИЗПИТВАНЕ

Преди да се предприемат изпитвания в рамките на стратегията за последователно изпитване (вж. фигурата), следва да се разгледа цялата налична информация, за да се оцени необходимостта от провеждане на *in vivo* изпитване върху очите. Въпреки че при оценката на отделни параметри (например при много високи или ниски стойности на pH) може да се получи съществена информация, следва да се разгледат всички съществуващи данни. Всички сведения за ефектите на дадено вещество и неговите структурни аналози следва да бъдат оценени в процеса на вземане на решение и следва да се представи обосновката на взетото решение. На първо място следва да се обърне внимание на съществуващите данни за ефектите на веществото 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 за оценка на ефекта върху очите, следва да се разглеждат с предимство, защото те осигуряват информация, пряко свързана с действието на веществото върху очите. След това следва да се оценят данните от проучвания на кожното корозивно/дразнещо действие при хора и/или животни. Опитните животни не следва да се третират с вещества с известно корозивно или изразено дразнещо действие върху очите. Това се отнася и за вещества с корозивно/дразнещо действие върху кожата. Тези вещества следва да се разглеждат като корозивни/дразнещи и за очите. Също така не е необходимо да се провеждат *in vivo* изпитвания на вещества, за които съществуват достатъчно данни от предишни проучвания за отсъствие на очно дразнещо или корозивно действие.

Анализ на зависимостта „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 очно 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 и очите следва да се използват валидирани и утвърдени SAR подходи.

Физикохимични свойства и химична активност (стъпка 3). Химични вещества с много високо или много ниско pH (pH $\geq$ 11,5 или 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 pH, следва да се вземе под внимание и неговият алкално-киселинен резерв (или буферен капацитет) (5) (6). 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).

Оценка на други съществуващи данни (стъпка 4). На този етап следва да се оцени цялата налична информация за системната токсичност по дермален път на постъпване. Острата дермална токсичност на химичното вещество също следва да се вземе под внимание. Когато е доказано, че дадено химично вещество проявява висока токсичност по дермален път на постъпване, може да се прецени, че не е необходимо да се изпитва върху опитни животни. Въпреки че не винаги съществува връзка между острата дермална токсичност и очното дразнещо/корозивно действие, може да се приеме, че ако дадено вещество проявява висока токсичност по дермален път на постъпване, то може да прояви висока токсичност и при инсталиране в очите. Тези данни могат да се разгледат също и между стъпки 2 и 3.

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 кожно или очно дразнещо/корозивно действие (7)(8), не е необходимо да се изпитват върху животни. Може да се приеме, че тези вещества ще предизвикат подобни силно изразени ефекти *in vivo.* Когато не съществуват валидирани и утвърдени *in vitro/ex vivo* изпитвания, стъпки 5 и 6 се пропускат и се преминава директно към стъпка 7.

Оценка на in vivo дразнещото или корозивно действие на химичното вещество върху кожата (стъпка 7). Когато съществуващите данни за потенциалното очно дразнещо/корозивно действие на дадено вещество, получени от посочените по-горе проучвания, не са достатъчни, за да се извърши анализ и да се стигне до убедителни изводи, първо следва да се оцени потенциалното кожно дразнещо/корозивно действие посредством метод B.4 (4) и приложението към него (9). Когато е доказано, че веществото предизвиква корозивен ефект или силно изразено дразнене върху кожата, то следва да се разглежда като корозивно за очите, освен ако съществуват други данни, които не са в подкрепа на това заключение. Затова в този случай не е необходимо да се извършва *in vivo* изпитване за оценка на действието върху очите. Когато веществото не е корозивно или силно дразнещо за кожата, *in vivo* изпитването следва да се извърши.

▼B

In vivo изпитване върху зайци (стъпки 8 и 9). In vivo изпитването за оценка на действието върху очите следва да започне с изпитване върху едно опитно животно. Когато резултатите от него показват, че веществото проявява изразено очно дразнещо или корозивно действие, не следва да се извършва по-нататъшно изпитване. Когато при първоначалното изпитване не се наблюдават корозивен или изразен дразнещ ефект, се извършва потвърдително изпитване с две допълнителни животни.

ПРЕПРАТКИ

(1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme:Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22—24 January 1996 (http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A. P. and Fentem, J. H.(1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27,161—177.

(4) Testing method B.4. Acute Toxicity: dermal irritation/corrosion.

(5) Young, J. R., How, M. J., Walker, A. P., Worth W. M. H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro,* 2, 19—26.

(6) Neun, D. J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227—231.

(7) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Edsail, D. J., Holzhutter, H. G. and Liebsch, M.(1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483—524.

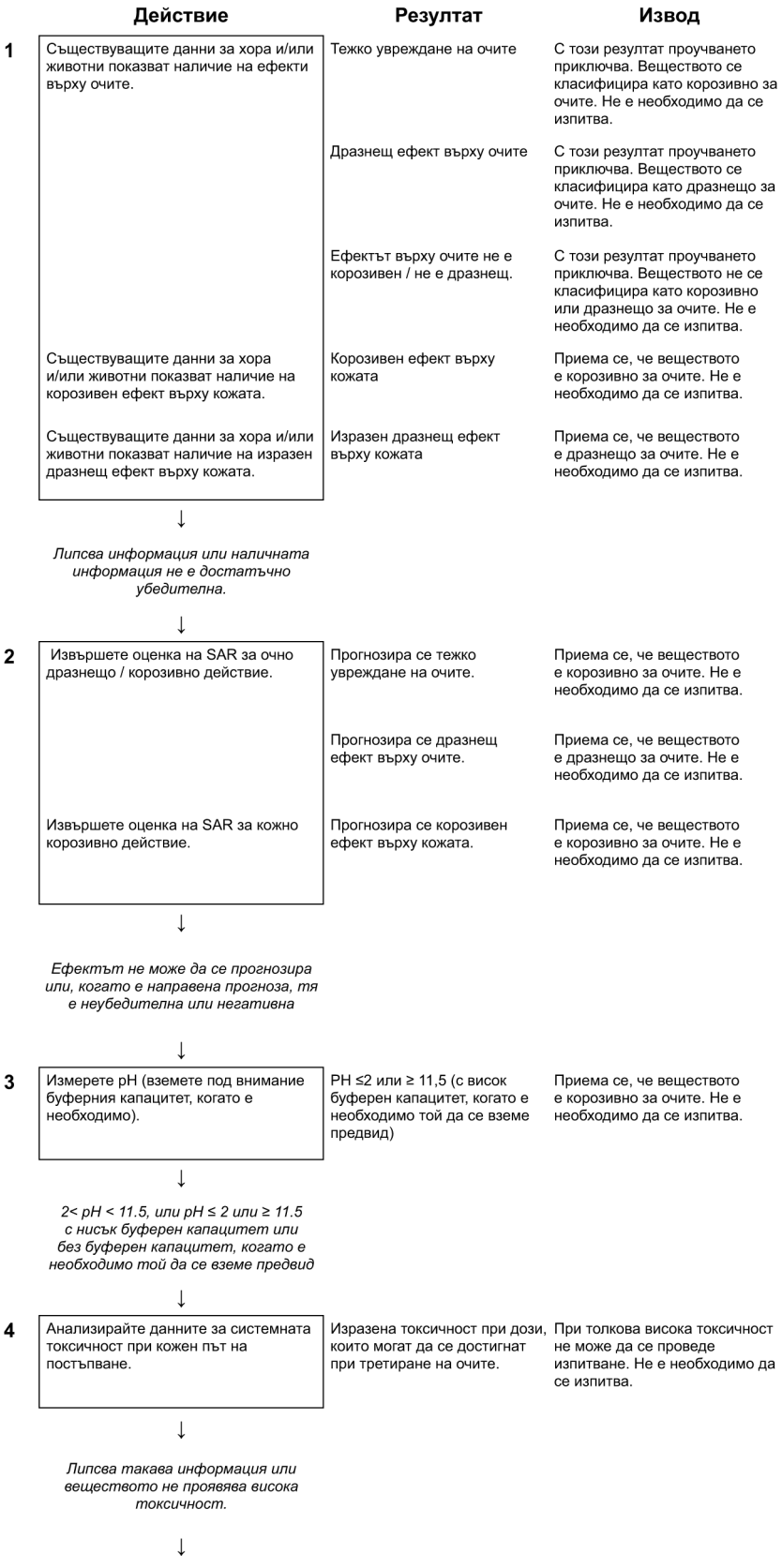
(8) Testing Method B.40 Skin Corrosion.

(9) приложение to Testing method B.4: A Sequential Testing Strategy for Skin Irritation and Corrosion.

▼B

Фигура

Стратегия за изпитване и оценка на дразнещо/корозивно действие върху очите



▼B

5	Проведете валидирано и утвърдено *in vitro* или *ex vivo* изпитване за очно корозивно действие.	Корозивен ефект	Приема се, че веществото е корозивно за очите. Не е необходимо по-нататъшно изпитване.
	↓		
	Веществото не проявява корозивен ефект или все още не са налице валидирани и утвърдени in vitro или ex vivo методи за оценка на очно корозивно действие.		
	↓		
6	Проведете валидирано и утвърдено *in vitro* или *ex vivo* изпитване за очно дразнещо действие.	Дразнещ ефект	Приема се, че веществото е дразнещо за очите. Не е необходимо по-нататъшно изпитване.
	↓		
	Веществото не проявява дразнещ ефект или все още не са налице валидирани и утвърдени in vitro *или* ex vivo *методи за оценка на очно дразнещо действие.*		
	↓		
7	Проведете *in vivo* изпитване за кожно дразнещо/ корозивно действие (вижте метод за изпитване B.4 и приложението към него).	Корозивен или изразен дразнещ ефект	Приема се, че веществото е корозивно за очите. Не е необходимо по-нататъшно изпитване.
	↓		
	Веществото не проявява корозивно или изразено дразнещо действие върху кожата.		
	↓		
8	Извършете първоначално *in vivo* изпитване за очно дразнещо/ корозивно действие върху един заек.	Тежко увреждане на очите	Веществото се класифицира като корозивно за очите. Не е необходимо по-нататъшно изпитване.
	↓		
	Увреждането не е тежко или не се наблюдава увреждане.		
	↓		
9	Извършете потвърдително изпитване върху едно или две допълнителни животни.	Корозивен или дразнещ ефект	Веществото се класифицира като корозивно или дразнещо за очите. Не е необходимо по- нататъшно изпитване.
		Липсва корозивен или дразнещ ефект.	Веществото не се класифицира като корозивно или дразнещо. Не е необходимо по-нататъшно изпитване.

▼B

Б.6. **КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ**

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Забележки:

Чувствителността и възможността на тестовете да определят потенциалните за човека кожни сенсибилизиращи 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 сенсибилизират 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 Freunds (FCA), и тестове без адювант.

Тестовете с адювант изглеждат по-точни при предсказване на възможните кожни сенсибилизиращи ефекти на дадено вещество у човека, отколкото методите, неизползващи адюванта на Freunds, 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 сенсибилизация, GPMT се смята за предпочитаната адювантна техника.

Неадювантните тестове, притежаващи 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 сенсибилизиращ 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 сенсибилизация: (алергичен контактен дерматит) имунологично медиирана кожна реакция към вещество. При човека отговорите се характеризират със сърбеж, еритем, оток, папули, везикули, були или комбинация от всички тях. При други видове реакциите 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 ииндукция, 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 сенсибилизация.

В добре проведения тест за слаби/умерено силни сенсибилизиращи 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 (хексилинамалдехид)	2-хексил-3-фенилпроп-2-енал (хексилинамалдехид)
149-30-4	205-736-8	бензотиазол-2-тиол (меркаптобензотиазол)	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 (GPMT)*

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 сенсибилизиращ 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. Мастноразтворимите 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 m1 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 cm^2. 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 почистено 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. **ДАННИ (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 позоваванията 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 (GMPT 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 медиирани 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, показа, 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 ОИСР за указания за изпитване. Предназначени са да подпомагат патолозите при техните изследвания и да допринасят за повишаването на чувствителността на анализа. Бяха открити множество различни параметри, които са показатели за свързана с ендокринната система токсичност, и които бяха включени в метода за изпитване. Параметри, за които наличните данни бяха недостатъчни за доказване на полезност, или при които липсваха убедителни доказателства в програмата на валидиране на способността им за подпомагане откриването на нарушители на функциите на ендокринната система, се предлагат като незадължителни крайни точки (вж. допълнение 2).

6. Въз основа на данните, получени в процеса на валидиране, трябва да се подчертае, че чувствителността на този анализ не е достатъчна за да се идентифицират всички вещества с (анти)андрогенни или (анти)естрогенни начини на действие (9). Методът за изпитване не се извършва в жизнен стадий, който е най-чувствителен към нарушения на функциите на ендокринната система. Въпреки това по време на процеса на валидиране методът за изпитване идентифицира вещества, слабо и силно засягащи функцията на щитовидната жлеза, силно и умерено ендокринно активни вещества, действащи чрез естрогенни или андрогени рецептори, но в повечето случаи не е успял да идентифицира ендокринно активни вещества, които слабо засягат естрогенните или андрогени рецептори. Поради това той не може да бъде описан като скринингов анализ на ендокринна дейност.

7. Следователно, липсата на ефекти, свързани с тези начини на действие, не може да бъде приета като доказателство за липсата на ефект върху ендокринната система. Следователно по отношение на ендокринно медиираните 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 ОИСР (14).

9. Определенията са дадени в допълнение 1.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

10. Изпитваният химикал се прилага всекидневно през устата в постепенни дози към няколко групи от опитни животни, по едно ниво на доза за група за период от 28 дни. По време на периода на прилагане животните се наблюдават отблизо — всеки ден — за признаци на токсичност. Животните, които умират или са подложени на евтаназия по време на изпитването, се аутопсират, а при завършване на изпитването преживелите животни се подлагат на евтаназия и също се аутопсират. 28-дневното изследване предоставя информация относно въздействията от повтаряща се орална експозиция и може да покаже необходимост от допълнителни дългосрочни изследвания. То

▼M4

може да даде информация и за избора на концентрации за подългосрочни 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 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 познават токсичните характеристики на носителя. Трябва да бъде определена стабилността на изпитвания химикал в носителя.

ПРОЦЕДУРА

Брой и пол на животните

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

Дозиране

18. Обикновено следва да се използват най-малко три опитни и една контролна групи, но ако от оценката на други данни се установи, че не се очакват ефекти при доза от 1 000 mg на kg телесно тегло на ден, може да бъде проведено изпитване при пределна концентрация. Ако няма достъпни подходящи данни, може да се проведе изследване за определяне на обхвата (с животни от същата порода и източник), което да подпомогне определянето на използваните дози. С изключение на третиране с изпитвания химикал, животните в контролна група трябва да бъдат отглеждани по идентичен начин на този, при животните от изпитвана група. Ако за прилагане на изпитвания химикал се използва носител, контролната група трябва да получава най-голямото използвано количество носител.

19. Нивата на доза следва да се подбират, като се имат предвид всички достъпни токсикологични и токсикокинетични данни за изпитвания химикал или за свързани с него химикали. Целта при избор на най-високото ниво на доза е индуциране на токсични ефекти, но не смърт или силно страдание. След това следва да се подбират постепенно намаляващи нива на доза с оглед установяване на всеки един свързан с дозата отговор и на NOAEL. За определяне на последователно намаляващите нива на доза в повечето случаи е най-подходящо всяка доза да намалява два до четири пъти спрямо най-близката по-висока доза, а добавянето на допълнителна четвърта изпитвана група често е за предпочитане пред използването на твърде големи интервали между дозите (напр. намаление повече от 10 пъти).

20. В присъствието на наблюдавана обща токсичност (например намаляване на телесното тегло, ефекти върху черния дроб, сърцето, белите дробове, бъбреците и др.) или други промени, които може да не са токсични реакции (напр. редуциран хранителен прием, увеличен черен дроб), наблюдаваните въздействия върху имунни, неврологични и ендокринни чувствителни крайни точки следва да се интерпретират предпазливо.

Изпитване при пределна концентрация

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

▼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 ограничат 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 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, pH, белтъци, глюкоза и кръв/кръвни клетки.

([1]) За редица измервания на серума и плазмата, и най-вече за глюкозата, се предпочита гладуване през нощта преди измерването. Основната причина за това предпочитание е, че нарасналата вариация, която неминуемо би последвала ако не се прилага гладуване, би могла да замаскира по-трудно 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 °C за съхранение. Следните фактори могат да повлияят на варирането и на абсолютните концентрации при определянето на хормони:

— времето на умъртвяване, поради дневните колебания в концентрацията на хормони

— методът на умъртвяване, за да се избегне ненужен стрес за животните, който може да повлияе на концентрациите на хормони

— комплектите за изпитване за определяне на хормони, които могат да се различават по стандартните си криви.

Окончателната идентификация на тиреоидно активни химикали е по-надеждна чрез хистопатологичен анализ, отколкото чрез нива на хормони.

38. Пробите от плазма, специално предназначени за определяне на хормони, следва да бъдат получени в сравними периоди през деня. Препоръчва се да се разгледа възможността за определяне на T_3, T_4 и TSH, инициирано въз основа на изменения в тиреоидната хистопатология. Числовите стойности, получени при анализа на концентрации на хормони, се различават при употребата на различни търговски комплекти за анализ. Следователно, може да е невъзможно да се предоставят критерии за параметрите, основаващи се на единни данни за минали периоди. Като алтернатива, лабораториите следва да се стремят да запазят контролните коефициенти на вариация под 25 за T_3 и T_4 и под 35 за TSH. Всички концентрации следва да бъдат записвани в ng/ml.

39. Ако базовите данни за минали периоди са недостатъчни, следва да се разгледа възможност за определяне на хематологичните и клиничните биохимични променливи преди началото на дозирането или за предпочитане в набор от животни, които не са включени в опитните групи.

ПАТОЛОГИЯ

Макроскопска аутопсия

40. Всички животни, подложени на изследване, са обект на цялостна, подробна макроскопска аутопсия, която включва внимателно изследване на външната повърхност на тялото, всички отвори и черепната, гръдната и коремната кухини и тяхното съдържание. Черният дроб, бъбреците, надбъбречните жлези, тестисите, епидидимите, простатата + семенните мехурчета с коагулиращите жлези като цяло, тимусът, далакът, мозъкът и сърцето на всички животни (независимо от животните, намерени в терминално състояние и/или умъртвени преди прекратяването на изследването) следва да се почистят от 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 ОИСР 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 голямопищялен), за предпочитане в непосредствена близост до мускула, скелетен мускул и кост с костен мозък (срез от костен мозък или, като алтернатива, костномозъчен аспират, прясно фиксиран). Препоръчва се тестисите да бъдат фиксирани чрез потапяне във фиксатор на Bouin или модифициран фиксатор на Davidson (16) (17). Tunica albuginea трябва да бъде леко пробита на неголяма дълбочина в двата края на органа с игла, за да се позволи бързото проникване на фиксатора. Клиничните и другите находки могат да посочат необходимостта от изследвания на допълнителни тъкани. Също така всички органи, които на основата на познатите свойства на изпитвания химикал се считат за вероятни прицелни органи, следва да бъдат консервирани.

44. Следните тъкани могат да предоставят ценни показания за свързани с ендокринната система последици: Полови жлези (яйчници и тестиси), допълнителни полови органи (матка, включително шийка, епидидими, семенни мехурчета с коагулиращите жлези, локализирана дорзолатерално и вентрално простата), влагалище, хипофиза, мъжка млечна жлеза, щитовидна жлеза и надбъбречна жлеза. Измененията в мъжките млечни жлези не са достатъчно документирани, но този параметър може да бъде много чувствителен към вещества с естрогенно действие. Наблюдението на органи/тъкани, които не са изброени в точка 43, е като опция (вж. допълнение 2).

45. В Указанията за хистопатология (19) се съдържа допълнителна подробна информация относно дисекцията, фиксирането, разрязването и хистопатологията на ендокринните тъкани.

46. В международната програма за изпитване са получени някои доказателства, че едва доловими ендокринни ефекти от химикали с нисък потенциал за засягане хомеостазата на половите хормони могат да бъдат определяни от смущения в синхронизирането на естралния цикъл в различни тъкани, а не толкова от явни хистопатологични изменения в женските полови органи. Въпреки че не е получено окончателно доказателство за такива въздействия, препоръчва се доказателствата за евентуална асинхронност на естралния цикъл да бъдат вземани под внимание при интерпретиране на хистопатологията на яйчниците (фоликулни, тека и гранулозни клетки), матката, шийката на матката и влагалището. Ако се прави оценка на етапа от цикъла, както е определен с вагинални намазки, той също би могъл да бъде включен в това сравнение.

▼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 увежданията, 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.

Заключения.

▼**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. T_3) в организъм на бозайник.

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

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

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

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

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

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

Тиреоидна активност е способността на даден химикал да действа като естествен тиреоиден хормон (напр. T_3) в организъм на бозайник.

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

▼M4

Допълнение 2

Крайни точки, препоръчани за откриване на нарушители на функциите на ендокринната система при настоящия метод б.7

Задължителни крайни точки	Незадължителни крайни точки
Тегло	
— Тестиси — Епидидими — Надбъбречни жлези — Простата + семенни мехурчета с коагулиращите жлези	— Яйчници — Матка, включително шийката — Щитовидна жлеза
Хистопатология	
— Полови жлези: — тестиси и — яйчници — Допълнителни полови органи: — епидидими, — простата + семенни мехурчета с коагулиращите жлези — матка, включително шийката — Надбъбречна жлеза — Щитовидна жлеза — Влагалище	— Вагинални намазки — Мъжки млечни жлези — Хипофиза
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.htm l

(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, Warbrittion 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 характеризиране на токсичността на даден изпитван химикал.

УВОД

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

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

3. Цялата налична информация за изпитвания химикал следва да бъде разгледана от лабораторията, извършваща изпитвания, преди провеждане на изследването с цел повишаване качеството на изследването и свеждане до минимум на използването на животни. Информация, която ще допринесе за избор на подходящи концентрации на изпитване, може да включва данни за идентификация, химична структура и физични и химични свойства на изпитвания химикал; резултати от всякакви изпитвания за токсичност, извършени *in vitro* или *in vivo*; очаквани употреби и потенциал за експозиция на човека; налични данни за (количествена) зависимост структура-активност и токсикологични данни за вещества със сходна структура; и данни, получени от изпитвания за остра инхалаторна токсичност. Ако в хода на изследването се очаква или се наблюдава невротоксичност, ръководителят на изследването може да предпочете да включи подходящи оценки като например батерия от функционални изпитвания (FOB) и измерване на двигателната активност. Въпреки че по отношение на специфични изследвания моментът на експозициите може да бъде от решаващо значение, изпълнението на тези допълнителни дейности не следва да пречи на основния план на изследването.

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

12. Изследването за определяне на обхвата може да включва едно или повече равнища на концентрация. Не повече от три животни от мъжки и три от женски пол трябва да бъдат експонирани на всяко равнище на концентрация. Изследването за определяне на обхвата трябва да продължи най-малко 5 дни и по принцип не повече от 14 дни. Обосновката за избора на 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, лактатдехидрогеназа 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 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.

— 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 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 контрола за 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

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 контрол на всички относими динамични параметри, свързани с инхалацията. Ако се

▼M4

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 масспектрометрия 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 въглеводороди (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 ± 10 % за газовете и парите или ± 20 % за течните или твърдите аерозоли. Времето за уравновесяване на камерата (t_{95}) следва да се изчислява и докладва. Продължителността на експозицията обхваща времето за генериране на изпитвания химикал. Тук се взема под внимание времето за уравновесяване на камерата (t_{95}) и за разпад. Указания за оценката на t_{95} могат да бъдат намерени в GD 39 (2).

27. При много сложни смеси, съставени от газове/пари и аерозоли (например атмосфера след горене и изпитвани химикали, отделяни от целеви продукти/оборудване за крайна употреба), всяка фаза може да реагира по различен начин в инхалационната камера. Следователно от всяка фаза (газ/пари и аерозол) следва да бъде избрано най-малко едно вещество (аналит), служещо като показател, като обичайно това е основното активно вещество в сместа. Когато изпитваният химикал е смес, аналитичната концентрация следва да се докладва за цялата смес, а не само за активната съставка или за веществото, служещо като показател (аналита). Допълнителна информация относно действителните концентрации може да бъде намерена в GD 39 (2).

Изпитван химикал: Разпределение според размера на частиците

28. Разпределението според размера на частиците на аерозоли трябва да се определя най-малко веднъж седмично за всяко равнище на концентрация, като се използва каскаден импактор или алтернативен инструмент, като например спектрометър за определяне на размера на аеродинамични частици. Ако може да бъде доказана равностойността на резултатите, получени от 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 поглътител с въвеждаща тръбичка (импинджер)/барботиращ апарат, за да се потвърди ефикасността на пробовземането на основния инструмент. Масовата концентрация, получена чрез анализ на размера на частиците, следва да бъде в рамките на разумни граници от масовата концентрация, получена чрез филтруване [вж. GD 39 (2)]. В случай че тяхната равностойност може да бъде доказана при всички изпитвани концентрации в ранния етап на изследването, могат да не се извършват допълнителни измервания за потвърждение. От съображения за хуманно отношение към животните следва да се вземат мерки за свеждане до минимум на недостатъчните за формулиране на заключение данни, които могат да доведат до необходимост от повтаряне на дадено изследване.

30. Определяне на размера на частиците трябва да бъде направено за пари, ако съществува вероятност кондензация на парите да доведе до образуване на аерозол, или ако бъдат открити частици в атмосфера от пари с потенциал за смесени фази.

НАБЛЮДЕНИЯ

31. Върху животните трябва да бъдат извършвани клинични наблюдения преди, по време на периода на експозиция и след него. Може да има показания за по-чести наблюдения в зависимост от отговора на животните по време на експозицията. Когато наблюдението на животните е възпрепятствано от използването на ограничителни тръби за животните, недостатъчно осветени камери за експозиция на цялото тяло, или непрозрачна атмосфера, животните следва да се наблюдават внимателно след експозицията. При наблюденията преди експозицията на следващия ден, може да се извърши оценка на всякаква обратимост или задълбочаване на токсичните ефекти.

▼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, лактатдехидрогеназа, сорбитолдехидрогеназа, глутаматдехидрогеназа, 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 (цвят 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 увреждания 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 консервивани 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 % буфериран 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
	Всички макроскопски увреждания
Нософарингсни тъкани (най-малко 4 равнища; 1 равнище следва да включва нософарингсния канал и назално асоцииранатa лимфоидна тъкан (NALT))	
Хранопровод	
[Обонятелна луковица]	
Яйчници	

▼M4

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

42. Най-малко 4 равнища на нософарингсните тъкани трябва да бъдат изследвани, едното от които следва да включва нософарингсния 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 дренiращата 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/m^3 и т.н.), а не в единици за отношение на обем (ppm, ppb и т.н.).

— Разпределение на частиците по размер, аеродинамичен диаметър при медианата на масата на частиците (MMAD) и геометрично стандартно отклонение (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 пробовземане за определяне на концентрацията и разпределението на частиците по размери в камерата.

— Подробна информация за използвания метод за анализ на химикала и за валидирането на метода (включително и ефикасността на добива на изпитвания химикал от матрицата на пробата).

— Метод на случаен подбор при разпределяне на животните в изпитвани и контролни групи.

— Подробна информация за качеството на храната и водата (включително тип на хранителния режим/източник, водоизточник).

— Обосновката за избора на концентрациите за изпитване.

Резултати

— Таблично представяне на данните за температурата, относителната влажност и въздушния поток в камерата.

— Таблично представяне на данните за номиналната и действителната концентрация в камерата.

— Таблично представяне на данните за размера на частиците, включително аналитични данни за пробовземането, за разпределението на частиците по размери, и изчисления на MMAD и 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 ОИСР за хуманен край (3).

— Трябва да бъде идентифициран прицелният орган(и).

— Трябва да бъдат определени нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект (NOAEL) и най-ниската доза, при която се наблюдава неблагоприятен ефект (LOAEL).

ПРЕПРАТКИ:

(1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline № 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**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 ± 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 приложения 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 използваема 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, автолиза на тъканите или неправилно положение в клетката. В края на проучвателния период всички оцелели животни от основните (несателитните) третирани 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 трансаминаза), серумна аспартат аминотрансфераза (първоначално позната като глутамат оксалоацетат трансаминаза), 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 третирани 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.

▼B

Б.10. **МУТАГЕННОСТ — ТЕСТ *ИН ВИТРО* ЗА ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ ПРИ БОЗАЙНИЦИ**

1. **МЕТОД**

Настоящият метод е изцяло подобен на теста *in vitro* за хромозомни аберации при бозайници на OECD TG 473 от 1997 г.

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Целта на теста *in vitro* за хромозомни аберации е да се идентифицират агентите, причиняващи структурни хромозомни аберации в култивирани клетки от бозайници (1) (2) (3). 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. Увеличение в полиплоидията може да е показателно за това, че един химикал има потенциал да предизвиква геномни аберации. Все пак настоящият метод не е предназначен да измерва геномни аберации и не се използва рутинно за тази цел. Хромозомните мутации и свързаните с тях събития са причината за много генетични болести при човека, а има реални доказателства, че хромозомните мутации и свързаните с тях събития, които водят до промени в онкогените и тумороподтискащите гени на соматични клетки, участват в причиняването на рак при хора и опитни животни.

За *in vitro* теста за хромозомни аберации могат да се използват култури на доказани клетъчни линии, клетъчни щамове или първични клетъчни култури. Клетките се избират въз основа на способността на растеж в културата, стабилността на кариотипа, броя на хромозомите, хромозомното разнообразие и спонтанната честота на хромозомни аберации.

Тестове, провеждани *in vitro,* по принцип изискват използването на екзогенен източник на метаболична активация. Тази система на метаболична активация не може изцяло да възпроизведе *in vivo* условията при бозайници. Следва внимателно да се избягват условия, които биха довели до положителни резултати, неотразяващи свойствена мутагенност и които биха могли да възникнат от промени на pH, осмотично налягане или високи нива на цитотоксичност (4) (5).

Настоящият тест се използва за откриване на евентуални мутагени и канцерогени при бозайници. 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 се появяват все повече доказателства, че съществуват канцерогени, които не се откриват с настоящия тест, тъй като очевидно те действат чрез други механизми, различни от прякото увреждане на ДНК.

Вижте също Общо въведение, част Б.

1.2. ДЕФИНИЦИИ

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 двата хроматида от една и съща страна.

▼B

Ендоредупликация: процес, при които след период S на ДНК репликация 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 един хроматид с минимална несъосност на хроматидите.

Митотичен индекс: съотношението на клетки в метафаза, разделени на броя клетки, наблюдавани в клетъчна популация; показател за степента на пролиферация на тази популация.

Гсномна аберация: промяна в броя на хромозомите в сравнение с нормалния брой, характерен за използваните клетки.

Полиплоидия: множимо на хаплоидния брой хромозоми (*n*), различно от диплоидния брой (т.е. 3*n*, 4*n* и т.н.).

Структурна аберация: промяна в хромозомната структура, която се открива при микроскопско изследване на етапа на метафаза на клетъчното деление, наблюдавана във вид на заличавания и фрагменти, вътрешнохромозомни или междухромозомни изменения.

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ТЕСТА

Клетъчни култури се подлагат на въздействието на тестваното вещество със и без метаболична активизация. На предварително определени интервали след експозицията на клетъчните култури към тестваното вещество те се третират с блокиращо метафазата вещество (напр. Колцемид® или колхицин), събират се, оцветяват се и метафазните клетки се анализират под микроскоп за наличието на хромозомни аберации.

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ТЕСТА

1.4.1. **Подготовка**

1.4.1.1. *Клетки*

Могат да се използват разнообразни клетъчни линии, щамове или първични клетъчни култури, включително и човешки клетки (напр. фибробласти от китайски хамстер, лимфоцити от периферна кръв на хора или други бозайници).

1.4.1.2. *Хранителни среди и условия за отглеждане на културата*

При отглеждането на културата следва да се използват подходящи хранителни среди и инкубационни условия (носители на културата, концентрация на CO_2, температура и влажност). Доказаните клетъчни линии и щамове следва да се проверяват редовно за стабилност на модалния хромозомен брой и отсъствие на микоплазмено замърсяване, а ако са замърсени, не следва да се използват. Следва да се знае нормалното време на клетъчен цикъл при клетките и използваните условия за отглеждане на културата.

1.4.1.3. *Приготвяне на културите*

Установени клетъчни линии и щамове: от изходни култури се размножават клетки, посяват се в хранителна среда с такава гъстота, че културите да не достигат точката на сливане преди времето на обиране, и се инкубират при 37 °C.

▼B

Лимфоцити: цялостна кръв, третирана с антикоагулант (напр. хепарин), или сепарирани лимфоцити, получени от здрави субекти, се добавят към хранителната среда, съдържаща митоген (напр. фитохемаглутинин), и се инкубират при 37 ºC.

1.4.1.4. *Метаболична активация*

Клетките следва да се излагат на тестваното вещество както в присъствието, така и в отсъствието 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 (6) (7) (8) (9) или смес от фенобарбитон и β-нафтофлавон (10) (11) (12).

Постмитохондричната фракция обичайно се използва в концентрации с обхват от 1 до 10 % v/v в последната тестова среда. Състоянието на система за метаболична активация може да зависи от изпитвания химикал. В някои случаи може да е подходящо да се прилага повече от една концентрация на постмитохондрична фракция.

Редица разработки, включително изграждането на клетъчни линии чрез генно инженерство, изразяващи специфични активизиращи ензими, могат да осигурят възможности за ендогенна активация. Изборът на използваните клетъчни линии следва да е научно обоснован (напр. чрез приложимостта на изоензим цитохром P450 за метаболизма на тестваното вещество).

1.4.1.5. *Тествано вещество/подготовка*

Твърдите вещества за теста следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители и, ако е необходимо, да се разредят преди третирането на клетките. Течните тествани вещества могат да се добавят директно към тестовите системи и/или да се разредят преди третирането. Следва да се използват пресни препарати на тестваното вещество, освен ако данните за устойчивостта 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 има 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 експозицията*

Измежду критериите, които следва да се имат предвид при определянето на най-високите концентрации, са цитотоксичността, разтворимостта в тестовата система и промените в pH или осмотичното налягане.

Цитотоксичността следва да се определи със и без метаболична активация в главния експеримент, като се използва подходяща индикация на клетъчната цялост и растеж, като степен на сливане, количества жизнеспособни клетки или митотичен индекс. Може да бъде полезно, ако се определят цитотоксичността и разтворимостта в предварителен експеримент.

▼B

Следва да се използват най-малко три концентрации, които могат да бъдат подложени на анализ. Там, където се среща цитотоксичност, тези три концентрации следва да покриват обхват от максимална до слаба или липса на токсичност; това обикновено означава, че концентрациите следва да се различават с коефициент не повече от 2 до √10. В момента на събиране на реколтата най-високата концентрация следва да показва значително намаляване на степента на сливане, клетъчния брой или митотичния индекс (всички са повече от 50 %). Митотичният индекс е само едно косвено мерило за цитотоксичните/-цитостатичните ефекти и зависи от времето след третирането. Все пак митотичният индекс е приложим за суспензионни култури, при които други начини на измерване на токсичността могат да се окажат неудобни и непрактични. Информацията за клетъчната кинетика, като например средно генерационно време (СГВ), може да се използва като допълваща информация. СГВ обаче е едно общо средно число, което не винаги е показателно за съществуването на забавени субпопулации, а дори съвсем малко увеличение на средното генерационно време може да се свърже с особено голямо забавяне на времето на оптимален добив на аберации.

За относително нецитотоксични вещества максималната тестова концентрация следва да е 5µl/ml, 5 mg/ml или 0,01 M, в зависимост от това коя е най-ниска.

За относително неразтворими вещества, които не са токсични в концентрации, по-ниски от неразтворимата концентрация, най-високата използвана доза следва да е в концентрация над границата на разтворимост в последната хранителна среда в края на периода на третиране. В някои случаи (напр. когато токсичността се получава само с концентрация, по-висока от най-ниската неразтворима концентрация), препоръчително е тестът да се провежда при повече от една концентрация с видимо утаяване. Полезно би било разтворимостта да се прецени в началото и в края на обработването, тъй като разтворимостта може да се измени по време на курса на експозиция в тестовата система поради наличието на клетки, серум S9 и др. Неразтворимостта може да се установи и с просто око. Преципитатът не следва да пречи на отчитането.

1.4.2.3. *Отрицателни и положителни контроли*

Във всеки експеримент следва да се включат паралелни положителни и отрицателни (разтворител или носител) контроли, със и без метаболична активация. Когато се прилага метаболична активация, химикалът за положителен контрол следва да е такъв, че да изисква активация, за да произведе мутагенна реакция.

За извършване на положителни контроли следва да се използва известен еластоген при нива на експозиция, при които се очаква да се достигне репродуцируемо и забележимо увеличение спрямо фон, показващ нагледно чувствителността на тестовата система.

Концентрациите на положителен контрол следва да са така избрани, че ефектите да са ясни, но да не разкриват непосредствено на четящото устройство идентичността на кодираните предметни стъкла. Примерите за положителни контролни вещества включват:

Метаболична активация	Вещество	CAS №	Einecs №
Отсъствие на екзогенна метаболична активация	Метил метансулфонат	66-27-3	200-625-0
	Етил метансулфонат	62-50-0	200-536-7

▼B

Метаболична активация	Вещество	CAS №	Einecs №
	Етил нитрозокарбамид	759-73-9	212-072-2
	Митомицин C	50-07-7	200-008-6
	4-нитрохинолин-N-оксид	56-57-5	200-281-1
Наличие на екзогенна метаболична активация	бензо[*a*]пирен	50-32-8	200-028-5
	Циклофосфамид Циклофосфамид монохидрат	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Могат да се използват други подходящи положителни контролни вещества. За положителна контрола следва да се взема предвид използването на химикали, принадлежащи към химичен клас, когато такива са налични.

Отрицателните контроли, състоящи се само от разтворител или носител в средата, в която се извършва обработването, и третирани по същия начин като културите, които се обработват, следва да се включат за всяко прибиране на клетъчна реколта. В допълнение към това следва също да се използват нетретирани контроли, освен ако няма контролни данни от предишни изследвания, показващи, че от избрания разтворител не се предизвикват делеционни или мутагенни ефекти.

1.4.3. **Процедура**

1.4.3.1. *Третиране с тестваното вещество*

Пролифериращите клетки се обработват с тестваното вещество при наличието и при отсъствието на метаболична активационна система. Третирането на лимфоцити следва да започне около 48 часа след митогенната стимулация.

1.4.3.2. Нормално за всяка концентрация следва да е използването на дубликатни култури, а те са силно препоръчителни и за отрицателни/разтворителни контролни култури. Когато на базата на данни от предишни изследвания може да се демонстрира минимално вариране между дубликатни култури (13) (14), би могло да се приеме използването на една култура за всяка концентрация.

Газообразни или летливи вещества следва да се тестват чрез подходящи методи, като например в запечатани носители на културата (15) (16).

1.4.3.3. *Време за събиране на реколтата от културата*

В първия експеримент клетките следва да се експонират на въздействието на тестваното вещество както със, така и без метаболична активация, в продължение на 3 до 6 часа и да се вземе проба след време, равно на около 1,5 пъти от нормалната продължителност на клетъчния цикъл след началото на третирането (12). Ако тази процедура дава отрицателни резултати както със, така и без активация, следва да се извърши допълнителен експеримент без активация, с непрекъснато третиране до вземането на проба след време, равно на около 1,5 пъти от нормалната продължителност на клетъчния цикъл. Някои химични вещества могат по-лесно да се различат при периоди на обработване/вземане на проба, подълги от 1,5 пъти от продължителността на клетъчния цикъл. Отрицателните резултати с метаболична активация следва да се потвърдят за всеки случай поотделно. В случаите, когато се смята, че не е необходимо потвърждаването на отрицателни резултати, това следва да е обосновано.

▼B

1.4.3.4. *Подготовка на хромозомите*

Клетъчните култури се третират с Колцемид ® или колхицин обикновено в продължение на 1 до 3 часа преди събирането на реколтата. Всяка клетъчна култура се обира и обработва отделно за подготовката на хромозомите. Подготовка на хромозомите включва хипотонично третиране на клетките, фиксиране и оцветяване

1.4.3.5. *Анализ*

Всички предметни стъкла, включително и тези на положителните и отрицателните контроли, следва да се кодират независимо едно от друго преди микроскопския анализ. Тъй като процедурите на фиксиране водят често до разкъсване на част от метафазните клетки със загуба на хромозоми, отчетените клетки следва да съдържат известен брой центромери, равен на модалния брой ± 2 за всички клетъчни типове. Следва да се отчетат най-малко 200 добре разнесени метафази за всяка концентрация и контрола, разделени поравно между дубликатите, ако това е приложимо. Този брой може да се намали, когато се наблюдава голям брой аберации.

Въпреки че целта на теста е да се открият структурни хромозомни аберации, от значение е да се регистрират полиплоидия и ендоредупликация, когато тези събития се наблюдават.

2. **ДАННИ**

2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Експерименталната единица е клетката и по тази причина следва да се оценява процентът на клетки със структурна(и) хромозомна(и) аберация(и). Следва да се изготвят списъци на различни типове структурни хромозомни аберации с техния брой и честоти при експерименталните и контролните култури. Празнините се отбелязват отделно и се протоколират, но по принцип не се включват в общата честота на аберациите.

Следва също да се документират съпътстващите измервания на цитотоксичността за всички третирани и отрицателни контролни култури в главните опити за аберации.

Следва да се осигурят данни за отделните култури. Освен това всички данни следва да се резюмират в табличен вид.

Няма изискване за потвърждаване на ясна положителна реакция. Двузначните резултати следва да се изяснят чрез допълнително тестване, като за предпочитане е условията на опита да се модифицират. Необходимостта от потвърждаване на отрицателни резултати е разгледана в т. 1.4.3.3. Изменението на параметрите на изследването с цел разширяване на обхвата на изследваните условия следва да се има предвид при последващите експерименти. Параметрите на изследването, които могат да се изменят, включват границите на концентрацията и условията на метаболична 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 в броя на клетки с хромозомни аберации. Първо, следва да се вземе предвид биологичната значимост на резултатите. При оценката на резултатите от теста биха могли да се използват статистически методи (3) (13). Статистическата значимост не следва да е единственият решаващ фактор за положителна реакция.

▼B

Едно увеличение в броя на полиплоидни клетки може да показва, че тестваното вещество е способно да инхибира митотични процеси и да индуцира многобройни хромозомни аберации. Увеличение в броя на клетки с ендоредуплицирани хромозоми може да е показателно за способността на тестваното вещество да инхибира прогресията на клетъчния цикъл (17) (18).

Тествано вещество, за което резултатите не удовлетворяват горните критерии, се смята немутагенно в настоящата система.

Въпреки че повечето опити дават ясно положителни или отрицателни резултати, в редки случаи получените данни изключват възможността да се направи категорична преценка за активността на тестваното вещество. Резултатите могат да останат неясни или под въпрос, независимо от това колко пъти е повторен опитът.

Положителните резултати от теста *ин витро* за хромозомни аберации показват, че тестваното вещество индуцира структурни хромозомни аберации в култивирани соматични клетки на бозайници. Отрицателните резултати показват, че при условията на теста изследваното вещество не предизвиква хромозомни аберации в култивирани соматични клетки на бозайници.

3. **ДОКЛАДВАНЕ**

ДОКЛАД ЗА ТЕСТА

Докладът за теста следва да съдържа 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,

— кариотипни особености и дали използваният тип клетки е подходящ,

— отсъствие на микоплазма, ако е приложимо,

— информация за продължителността на клетъчния цикъл,

— пол на кръвните донори, цялостна кръв или изолирани лимфоцити, използван митоген,

— брой на пасажи, ако е приложим,

— методи за поддържане на клетъчна култура, ако са приложими,

— модален брой на хромозомите.

Условия за провеждане на теста:

— идентичност на веществото, блокиращо метафазата, концентрация и времетраене на експозицията на клетките,

— основна причина за избора на концентрации и брой култури, в т.ч. напр. цитотоксични данни и ограничения за разтворимостта, ако са налични,

— състав на средите, CO_2 концентрация, ако са приложими,

▼B

— концентрация на тестваното вещество,

— общ обем на носителя и тестваното вещество,

— температура на инкубация,

— време на инкубация,

— времетраене на третирането,

— гъстота на клетките при посяване, ако е необходимо,

— тип и състав на система за метаболична активация, в.т.ч. критериите за приемливост,

— положителни и отрицателни контроли,

— методи на подготовка на предметно стъкло,

— критерии за отчитане на аберации,

— брой на анализираните метафази,

— методи за измерване на токсичността,

— критерии за приемане на проучванията за положителни, отрицателни или двузначни,

Резултати:

— признаци на токсичност, напр. степен на сливане, данни за клетъчния цикъл, клетъчно броене, митотичен индекс,

— признаци на утаяване,

— данни за pH и осмотичното налягане на средата за тестване, ако са определени,

— дефиниция за аберации, в т.ч. празнини,

— брой на клетки с хромозомни аберации и тип на хромозомните аберации, дадени отделно за всяка третирана и контролна култура,

— изменения в полиплоидията, ако се наблюдават,

— взаимоотношение доза/реакция, при възможност,

— статистически анализ, ако има такъв,

— данни от паралелни отрицателни (разтворител/носител) и положителни контроли,

— данни от предишни изследвания от отрицателни (разтворител/носител) и положителни контроли, с обхвати, средни стойности и стандартни отклонения.

Обсъждане на резултатите.

Заключения.

4. **ПРЕПРАТКИ**

(1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, w: *Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection,* Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1—29.

(2) Ishidate, M. Jr. and Sofumi, T. (1985), The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in: *Progress in Mutation Research,* Vol. 5, Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 427—432.

▼B

(3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C, Colman, S., Brown, B., Cannon, C, Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Anderson, G. and Zeiger E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cellS: Evaluation of 108 chemicals, *Environs, Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), pp. 1—175.

(4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.,* 257, pp. 147—204.

(5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation* Res., 268, pp. 297—305.

(6) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 31, pp. 347—364.

(7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 113, pp. 173—215.

(8) Natarajan, A. T., Tates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/-Carcinogens after Activation in a Mircrosomal System *In Vitro,* I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res.,* 37, pp. 83—90.

(9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro, Mutation Res.,* 66, pp. 277—290.

(10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternative to Aroclor 1254-induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis, 7,* pp. 175—177.

(11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A. Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F. J. Fouts, J. R. Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), In Vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis Testing,* Elsevier, North-Holland, pp. 85—88.

(12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Ivett, J. L., Kirkland, D. J. Morita, T., Mosesso, P., Sofumi, T. (1994), Report from Working Group on in *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.,* 312, pp. 241—261.

(13) Richardson, C, Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989), Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays, w: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data,* Kirkland, D. J., (cd) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141—154.

(14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res.,* 312, pp. 139—149.

(15) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents,* New York, Plenum, pp. 91—103.

▼B

(16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis,* 5, pp. 795—801.

(17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha- radiation induced G2 arrest, *Mutation Res.,* 119, pp. 403—413.

(18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.,* 43, pp. 1362—1364

▼B

Б.11. МУТАГЕННОСТ — ТЕСТ *IN VIVO* ЗА ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ В КОСТНИЯ МОЗЪК НА БОЗАЙНИЦИ

1. МЕТОД

Настоящият метод е изцяло подобен на теста за хромозомни аберации в костния мозък на бозайници на OECD TG 475 от 1997 г.

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Тестът *in vivo* в микроядрата на клетки от бозайници се използва за откриване на структурни хромозомни аберации, индуцирани от тествано вещество в клетки от костен мозък на животни, обикновено гризачи (1) (2) (3) (4). Структурните хромозомни аберации могат да бъдат два вида: хромозомни или хроматидни. Едно увеличение в полиплоидията би могло да показва, че дадено химично вещество има потенциал да предизвиква геномни аберации. С повечето химични мутагени се предизвикват аберации от хроматиден тип, но хромозомният тип аберации също се срещат. Хромозомните аберации и свързаните с тях събития са причината за генетични болести у човека, а има реални доказателства, че хромозомните мутации и свързаните с тях събития, причиняващи промени в онкогените и тумороподтискащите гени, участват в причиняването на рак на хора и експериментални системи.

В настоящия тест обикновено се използват гризачи. Обект на настоящия тест е тъканта на костният мозък, тъй като последният представлява високо васкуларизирана тъкан и съдържа популация от бързо циклиращи клетки, които могат лесно да се изолират и обработят. Други видове и тъкани не са обекти на настоящия метод.

Настоящият тест за хромозомни аберации е от специално значение за оценка на мутагенната опасност, поради това че позволява разглеждане на фактори на *in vivo* метаболизма, фармакокинетиката и процесите на ДНК репарация, въпреки че те варират при различните видове и тъкани. Тест *in vivo* е също полезен за по-нататъшното изследване на мутагенния ефект, установен чрез тест *in vitro*.

Ако има доказателства, че тестваното вещество или реактивен метаболит няма да достигнат до тъканта, която е обект на изследване, не е подходящо да се използва в настоящия тест.

Вижте също Общо въведение, част Б.

1.2. ДЕФИНИЦИИ

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 двата хроматида на същата страна.

Ендоредупликация: процес, при който след период S на ДНК репликация 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 един хроматид с минимална несъосност на хроматида(ите).

Геномна аберация: промяна в броя на хромозомите в сравнение с нормалния брой, характерен за използваните клетки.

▼B

Полиплоидия: кратно число на хаплоидния брой хромозоми (*n*), различно от диплоидния брой (т.е. 3*n*, 4*n* и т.н.).

Структурна аберация: промяна в хромозомната структура, която се открива чрез микроскопско изследване на етапа на метафаза на клетъчното деление, наблюдавана във вид на заличавания и фрагменти, вътрешнохромозомни или междухромозомни изменения.

1.3 ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ТЕСТА

Животни се излагат на тестваното вещество по подходящ начин и се убиват в подходящи моменти след обработването. Преди убиването животните се третират с блокиращ метафазата агент (напр. колхицин или Колцемид®). След това се приготвя хромозомен препарат от клетки на костния мозък, 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 животински вид*

Обичайно използваните животни са плъхове, мишки и китайски хамстери, въпреки че всеки подходящ вид бозайник би могъл 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 са минимални и да не превишават ± 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 следва да се цели влажността на въздуха да е 50—60 %.

1.4.1.3. *Подготовка на животните*

Здрави, млади, пораснали животни се определят произволно 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 идентифакация. Животните се аклиматизират към лабораторните условия поне пет дни.

1.4.1.4. *Приготвяне на дози*

Твърдите вещества за теста следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители и, при необходимост, да се разредят преди даване на дозата на животните. Течните вещества за теста могат да се дават директно или да се разредят преди дозиране. Следва да се използват пресни препарати на тестваното вещество, освен ако данните за устойчивостта му не показват, че може да се съхранява.

1.4.2. **Условия за провеждане на теста**

1.4.2.1. *Разтворител/носител*

Разтворителят/носителят не следва да предизвиква 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.

▼B

1.4.2.2. *Контроли*

Във всеки тест следва да се включват паралелни положителни и отрицателни (разтворител/носител) контроли за всеки пол. Като се изключи третирането с тестваното вещество, животните в контролните групи следва да се третират по един и същи начин, както животните от опитните групи.

Положителните контроли следва да произвеждат структурни аберации *in vivo* при нива на експозиция, при които се очаква да се постигне забележимо увеличение спрямо дадения фон. 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 прилагат по различен начин от тестваното вещество и да им се взема проба само еднократно. За положителна контрола може да се разглежда използването на химикали, принадлежащи към химичен клас, когато такива са налични. Примерите за положителни контролни вещества включват:

Вещество	CAS №	EINECS №
Етил метасулфонат	62-50-0	200-536-7
Етил нитрозокарбамид	759-73-9	212-072-2
Митомицин C	50-07-7	200-008-6
Циклофосфамид Циклофосфамид монохидрат	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
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 с хромозомни аберации са доказани с контролни данни от предшестващи изследвания. Ако за отрицателни контроли се прилага еднократно вземане на проби, най-подходящият момент е първото вземане на проба. Освен това следва също да се използват нетретирани контроли, освен ако няма данни от предшестващи изследвания или публикувани контролни данни, показващи, че няма никакви вредни или мутагенни ефекти, предизвикани от избрания разтворител/носител.

1.5. ПРОЦЕДУРА

1.5.1. **Брой и пол на животните**

Всяка група от животни, с които се извършват опити, и всяка контролна група включват поне пет животни за анализ от един и същ пол. Ако по времето на изследването има налични данни от изследвания на същия вид и по същия начин на експозиция, които показват, че няма значителни разлики между половете по отношение на токсичността, то тестването на един пол ще бъде достатъчно. Когато експозицията на хора спрямо химически вещества може да е в специфична зависимост от пола, като например към някои фармацевтични агенти, тестът следва да се проведе с животни от подходящия пол.

1.5.2. **График на обработване**

За предпочитане е тестваните вещества да се въвеждат чрез еднократно третиране. Тестваните вещества могат също да се въвеждат като доза на отделни части, т.е. две обработвания в един и същи ден, разделени от не повече от няколко часа, за да се улесни прилагането на голям обем материал. Други режими на дозиране следва да са научно обосновани.

▼B

Пробите следва да се вземат в два отделни момента след третирането в един ден. За гризачи първият интервал на вземане на проба е 1,5 пъти от продължителността на нормалния клетъчен цикъл (който нормално е 12—18 часа) след третирането. Тъй като времето за поемането и метаболизма на тестваното вещество, както и за ефекта му върху кинетиката на клетъчния цикъл може да повлияе на оптималното време за откриване на хромозомни аберации, препоръчва се и вземане на по-късна проба 24 часа след първата проба. Ако се използват режими на дози за повече от един ден, следва да се взема една проба 1,5 пъти продължителността на нормалните клетъчни цикли след последното третиране.

Преди убиването животните се инжектират интраперитонеално с подходяща доза на блокиращ метафазата агент (напр. Колцемид® или колхицин). След това, след подходящ интервал от време от животните се взема проба. За мишки този интервал е приблизително 3—5 часа; за китайски хамстери — около 4—5 часа. Клетките се събират от костния мозък и се анализират за хромозомни аберации.

1.5.3. **Нива на дозиране**

Ако се извършва изследване за обхват, поради това че няма подходящи данни в наличност, то следва да е в същата лаборатория, като се използва същият вид, щам, пол и режим на третиране както в главното изследване (5). Ако има токсичност, за първото вземане на проба се използват три нива на дозиране. Тези нива на дозиране следва да включват обхват от максимална до слаба токсичност 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 от по-високи нива на дозиране, базирани на същия режим, би могло да се очаква да доведат до леталност. Вещества със специфични биологични активности при ниски, нетоксични дози (като хормони и митогени) могат да бъдат изключения от 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 костния мозък (напр. намаляване на митотичния индекс с повече от 50 %).

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 третирания в един и същи ден не дава забележими токсични ефекти, а не би могло да се очаква генотоксичност на базата на данни от структурно свързани вещества, то тогава пълно изследване с три нива на дозиране може да не се смята за необходимо. За по-дълготрайни изследвания граничната доза е 2 000 mg/kg/-телесно тегло на ден за период на третиране до 14 дни и 1 000 mg/kg/телесно тегло на ден за период на третиране, по-дълъг от 14 дни. Очакваната експозиция при 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, или чрез интраперитонеална инжекция. Други начини на експозиция биха били приемливи, ако могат да се обосноват. 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 2m1/100g телесно тегло. Обеми, по-високи от тези, следва да се обосноват. С изключение на дразнещи или корозивни вещества, които нормално дават изострящи ефекти при по-високи концентрации, варируемостта на тестовия обем следва да се сведе до минимум чрез регулиране на концентрацията с цел осигуряване на постоянен обем на всички нива на дозиране.

▼B

1.5.6. **Подготовка на хромозомите**

Непосредствено след убиването на животните костният мозък се извлича, експонира се в хипотоничен разтвор и се фиксира. След това клетките се разнасят върху предметни стъкла и се оцветяват.

1.5.7. **Анализ**

Митотичният индекс следва да се определи като мярка на цитотоксичност в най-малко 1 000 клетки на едно животно за всички опитни животни (включително и положителните контроли) и животни, които не са подлагани на опити, с отрицателни контроли.

За всяко животно следва да се анализират най-малко 100 клетки. Този брой би могъл да се намали, когато се наблюдава висок брой аберации. Всички предметни стъкла, включително и тези на положителните и отрицателните контроли, следва да се кодират поотделно преди анализа под микроскоп. Тъй като процедурите по подготовка на предметно стъкло често водят до разкъсване на част от метафазите със загуба на хромозоми, отчетените клетки следва да съдържат известен брой центромери, равни на броя 2n ± 2.

2. **ДАННИ**

2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Данните за всяко от животните следва да се представят в таблица. Експерименталната единица е животното. За всяко изследвано животно отделно се оценяват броят на отчетените клетки, броят на аберации на клетка и процентът на клетки със структурна(и) хромозомна(и) аберация(и). Следва да се покажат различните типове структурни хромозомни аберации с броя и честотата им за групите, при които се извършват опити, и за контролните групи. Празнини се регистрират отделно и се докладват, но принципно не се включват в общата честота на аберациите. Ако няма факти за разлика в реакцията между половете, данните от двата пола могат да се комбинират за статистическия анализ.

2.2. ОЦЕНКА И ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Има няколко критерия за определяне на положителен резултат, като например свързано с дозата увеличение в относителния брой на клетки с хромозомни аберации, или явно увеличение в броя на клетки с аберации в групата с еднократна доза и еднократно вземане на проба. Първо следва да се вземе предвид биологичната значимост на резултатите. Статистически методи може да се използват като помощно средство за оценката на резултатите от теста (6). Статистическата значимост не следва да е единственият решаващ фактор за положителна реакция. Двузначните резултати следва да се изяснят чрез още тестове, като за предпочитане е да се изменят условията на експеримента.

Увеличение в полоплоидията може да е показателно за това, че тестваното вещество има потенциала да индуцира геномни хромозомни аберации. Увеличение в ендоредупликацията може да показва, че тестваното вещество е в състояние да инхибира прогресията на клетъчния цикъл (7) (8).

Тествано вещество, за което резултатите не отговарят на горните критерии, се смята за немутагенно при настоящия тест.

▼B

Въпреки че повечето опити 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 неясни или под въпрос, независимо от това колко пъти е извършен опитът.

Положителните резултати от теста *in vivo* за хромозомни аберации показват, че тестваното вещество предизвиква структурни хромозомни аберации в костния мозък на тествания вид. Отрицателните резултати показват, че при условията за провеждане на теста тестваното вещество не предизвиква хромозомни аберации в костния мозък на тествания вид.

Следва да се обсъди вероятността тестваното вещество или метаболитите му да достигнат общото кръвообращение или по-конкретно тъканта, която е обект на тестването (напр. системна токсичност).

3. **ДОКЛАДВАНЕ**

3.1. 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.

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, средни стойности и стандартно отклонение за всяка група.

Условия за провеждане на теста:

— положителни и отрицателни (носител/разтворител) контролни данни,

— 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 начина на администриране,

— методи за проверка на достигането на тестваното вещество до общото кръвообращение или тъкан, която е обект на тестването, ако са приложими,

— 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 графиците на третиране и вземане на проби,

— методи на измерване на токсичността,

▼B

— идентичност на блокиращото метафазата вещество, концентрация и времетраене на третирането,

— методи на приготвяне на предметно стъкло,

— критерии за отчитане на аберации,

— брой на анализирани клетки/животно,

— критерии за определяне на изследванията като положителни, отрицателни или двузначни.

Резултати:

— признаци на токсичност,

— митотичен индекс,

— тип и брой на аберациите, дадени отделно 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 полиплоидията, ако се наблюдават,

— взаимоотношение доза/реакция, където е възможно,

— статистически анализи, ако има такива,

— паралелни отрицателни контролни данни,

— исторически отрицателни данни от предишни изследвания с обхвати, средни стойности и стандартни отклонения,

— паралелни положителни контролни данни.

Обсъждане на резултатите.

Заключения.

4. **ПРЕПРАТКИ**

(1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, w: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach,* S. Venitt and J. M. Parry (eds), IRL Press, Oxford, Washington D.C., pp. 275—306.

(2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian *In vivo* Cytogenetic AssayS: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res.,* 189, pp. 157—165.

(3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In vivo* Cytogenetic Assays, w: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115—141.

(4) Tice, R. R., Hayashi, M., MacGregaro, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Pacchierotti, F., Preston, R. J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *in Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutation Res.,* 312, pp. 305—312.

(5) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis,* 7, pp. 313—319.

▼B

(6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, w: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data,* D. J. Kirkland (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184—232.

(7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, *Mutation Res.,* 119, pp. 403—413.

(8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.,* 43, pp. 1362—1364.

▼B

Б.12. МУТАГЕННОСТ — *IN VIVO* МИКРОЯДРЕН ТЕСТ НА ЕРИТРОЦИТИ ОТ БОЗАЙНИЦИ

1. МЕТОД

Настоящият метод е изцяло подобен на микроядрен тест на еритроцити от бозайници на OECD TG 474 от 1997 г.

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Микроядрен тест *in vivo* на еритроцити от бозайници се използва за откриване на увреждания, предизвиквани от тестваното вещество, на хромозомите или митотичния апарат на еритробласти чрез анализ на еритроцити, така както са взети като проби от клетки в костния мозък и/или периферната кръв на животни, обичайно гризачи.

Целта на микроядрения тест е да се идентифицират вещества, причиняващи цитогенно увреждане, което води до образуването на микроядра, съдържащи изоставащи хромозомни фрагменти или цели хромозоми.

Когато еритробласт на костен мозък се развие в полихроматичен еритроцит, главното ядро се екструдира, а всяко образувано вече микроядро може да изостане в иначе обезядрената цитоплазма. Онагледяването на микроядрата се улеснява в тези клетки, тъй като на тях им липсва главното ядро. Увеличаването на честотата на полихроматични еритроцити с микроядра в третираните животни е показател за индуцирано хромозомно увреждане.

В настоящия тест обикновено се използва костният мозък на гризачи, тъй като в тази тъкан се произвеждат полихроматични еритроцити. Измерването на незрели (полихроматични) еритроцити с микроядра в периферна кръв е еднакво приемливо във всеки вид, при който неспособността на далака да отстранява еритроцити с микроядра е изявена или който е показал адекватна чувствителност да открива агенти, причиняващи структурни или геномни хромозомни аберации. Микроядрата могат да бъдат разграничени чрез редица критерии. Те включват идентификация на наличието или отсъствието на кинетохорна или центромерна ДНК в микроядрата. Честотата на незрели (полихроматични) еритроцити с микроядра е главната крайна точка. Броят на зрели (нормохроматични) еритроцити в периферната кръв, съдържащи микроядра измежду даден брой зрели еритроцити, може също да се използва като крайна точка за анализа на опита, когато животните се третират в продължение на четири или повече седмици.

Настоящият микроядрен тест *in vivo* на еритроцити от бозайници е особено важен за оценка на мутагенната опасност, поради това че дава възможност за разглеждане на фактори на процесите *in vivo* на метаболизма, фармакокинетиката и възстановителните процеси в ДНК, въпреки че те могат да варират според вида, тъканта и генетичните крайни точки. Анализ чрез тест *in vivo* е полезен и за по-нататъшното изследване на мутагенния ефект, установен чрез система *in vitro*.

Ако има доказателства, че тестваното вещество или реактивен метаболит няма да достигнат до тъкан, която е обект на анализ, не е подходящо да се използва настоящият тест.

Вижте също Общо въведение, част Б.

▼B

1.2. ДЕФИНИЦИИ

Центромера (Кинетохора): област(и) на хромозомата, с която(които) вретеновидни фибри се свързват по време на клетъчното деление, като така позволяват методично придвижване на дъщерните хромозоми към полюсите на дъщерните клетки.

Микроядра: малки ядра, отделни от главното ядро и в допълнение към него, на клетките, произведени по време на телофазата на митоза (мейоза) чрез изоставащи хромозомни фрагменти или цели хромозоми.

Нормохроматичен еритроцит: зрял еритроцит, на който му липсват рибозоми и може да бъде отличен от незрели, полихроматични еритроцити чрез оцветявания, селективни за рибозоми.

Полихроматичен еритроцит: незрял еритроцит в междинен етап на развитие, който все още съдържа рибозоми и следователно може да бъде отличен от зрели нормохроматични еритроцити чрез оцветявания, селективни за рибозоми.

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ТЕСТА

Животните се експонират на въздействието на тестваното вещество по подходящ начин. Ако се използва костен мозък, животните се убиват в подходящи моменти след третирането, костният мозък се извлича, а препаратите се изготвят и оцветяват (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Когато се използва периферна кръв, кръвта се взема в подходящи моменти след третирането, а препаратите за намазка се изготвят и оцветяват (4) (8) (9) (10). За опити с периферна кръв следва да мине възможно най-малко време между експозицията и обирането на реколтата от клетки. Препаратите се анализират за наличие на микроядра.

1.4. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ТЕСТА

1.4.1. **Подготовка**

1.4.1.1. *Подбор на животинския вид*

Ако се използва костен мозък, препоръчват се мишки или плъхове, въпреки че всеки подходящ вид от бозайници би могъл да се използва. Когато се използва периферна кръв, препоръчват се мишки. Все пак всеки подходящ вид от бозайници би могъл да се използва, при условие че това е вид, в който далакът не отстранява еритроцити с микроядра, или вид, показал адекватна чувствителност за откриване на агенти, които причиняват структурни или геномни хромозомни аберации. За теста следва да се вземат общо използваните лабораторни щамове на млади, здрави животни. В началото на изследването вариациите в теглото на животните следва да са минимални и да не превишават ± 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 50—60 %.

▼B

1.4.1.3. *Подготовка на животните*

Здрави млади животни се отделят на произволен принцип за контролните и опитните групи. На животните се дава уникална идентифакация. Животните са аклиматизират към лабораторните условия поне пет дни. Клетките следва да се подредят така, че да се намалят до минимум евентуалните ефекти от разполагането им.

1.4.1.4. *Приготвяне на дози*

Твърдите вещества за теста следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители и, при необходимост, да се разредят преди даване на дозата на животните. Течните вещества за теста могат да се дозират директно или да се разредят преди дозиране. Следва да се използват пресни препарати на тестваното вещество, освен ако данните за устойчивостта му не показват, че може да се съхранява.

1.4.2. **Условия за провеждане на теста**

1.4.2.1. *Разтворител/носител*

Разтворителят/носителят не следва да има токсично въздействие при използваните нива на дозиране, а също така не следва да предизвиква 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 за всеки пол. 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 групите, с които се извършват опити.

Положителните контроли следва да произвеждат микроядра *in vivo* при нива на експозиция, при които се очаква да се постигне забележимо увеличение спрямо съответния фон. 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 смята използването на химикали, принадлежащи към химичен клас, когато такива са налични. Примерите за положителни контролни вещества включват:

Вещество	CAS №	EINECS №
Етил метансулфонат	62-50-0	200-536-7
N- етил -N-нитрозокарбамид	759-73-9	212-072-2
Митомицин C	50-07-7	200-008-6
Циклофосфамид	50-18-0	200-015-4
Циклофосфамид монохидрат	6055-19-2	
Триетиленмеламин	51-18-3	200-083-5

▼B

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 с микроядра са доказани с контролни данни от предишни изследвания. Ако за отрицателни контроли се прилага еднократно вземане на проби, най-подходящият момент е първият. Освен това следва също да се използват необработени контроли, освен ако няма контролни данни от предишни изследвания или публикувани контролни данни, които показват, че няма никакви вредни или мутагенни ефекти, предизвикани от избрания разтворител/носител.

Ако се използва периферна кръв, проба преди третирането може да е приемлива в качеството на паралелна отрицателна контрола, но само при кратките изследвания на периферна кръв (напр. 1—3 третирания), когато резултантните данни са в очаквания обхват за контрола от предишни изследвания.

1.5. ПРОЦЕДУРА

1.5.1. **Брой и пол на животните**

Всяка група за опити и всяка контролна група следва да включват поне пет анализируеми животни от един пол (11). Ако по времето на изследването има налични данни от изследвания на същия вид и чрез същия начин на експозиция, които показват, че няма значителни разлики между половете по отношение на токсичността, то тестването на един пол ще бъде достатъчно. Когато експозицията на хора спрямо химически вещества може да е в специфична зависимост от пола, като например с някои фармацевтични агенти, тестът следва да се проведе с животни от подходящия пол.

1.5.2. **График на обработване**

Не може да се препоръча стандартен график на обработване (т.е. едно, две или повече третирания на 24-часови интервали). Пробите от обширни режими на дози са приемливи, доколкото е демонстриран положителен ефект за настоящото изследване, или за изследване с отрицателен ефект, доколкото е демонстрирана токсичността или е използвана граничната доза и дозирането е продължило до времето на вземане на проба. Тестваните вещества могат също да се администрират като разделена доза, т.е. две третирания в един и същи ден, разделени от не повече от няколко часа, за да се улесни даването на голям обем материал.

Тестът може да се извърши по два начина:

а) животните се третират веднъж с тестваното вещество. Проби от костен мозък се вземат най-малко два пъти, като се започне не по-рано от 24 часа след третирането, но не повече от 48 часа след третирането, на подходящи интервали между пробите. Вземането на проби по-рано от 24 часа след третирането следва да бъде обосновано. Проби от периферна кръв се вземат най-малко два пъти, като се започне не по-рано от 36 часа след третирането, на подходящи интервали след първото, но не повече от 72 часа. Когато се разпознае положителна реакция след едно вземане на проба, не се изисква допълнително вземане на проба;

▼B

б) ако се прилагат две или повече обработвания на ден (напр. две или повече третирания на 24-часови интервали), следва да се вземат проби веднъж между 18-ия и 24-ия час след последното третиране за костния мозък и веднъж между 36-ия и 48-ия час след последното третиране за периферната кръв (12).

Когато е уместно, може да се използва друг график на вземане на проби.

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 използва същият вид, щам, пол и режим на третиране, който се използва и в главното изследване (13). Ако има токсичност, за първото вземане на проба се използват три нива на дозиране. Тези нива на дозиране следва да включват обхват от максимална до слаба токсичност или липса на токсичност. При вземане на проба на по-късен етап е необходимо да се прилага само най-високата доза. 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. Вещества със специфични биологични активности при ниски, нетоксични дози (като хормони и митогени) могат да бъдат изключения по отношение на 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 костния мозък (напр. намаляване на съответната част от незрели еритроцити спрямо общия брой еритроцити в костния мозък или периферната кръв).

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 третирания 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 смята за необходимо. За по-дълготрайни изследвания граничната доза е 2 000 mg/kg/-телесно тегло/ден за период на третиране до 14 дни и 1 000 mg/kg/телесно тегло/ден за период на третиране, по-дълъг от 14 дни. Очакваната експозиция към 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 биха били приемливи, ако могат да се обосноват. 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. Използването на обеми, по-големи от тези, следва да бъде обосновано. С изключение на дразнещи или корозивни вещества, които нормално дават изостряща 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.

▼B

1.5.6. **Подготовка на костния мозък/кръвта**

Клетките на костния мозък обичайно се вземат от бедрените кости или от тибиите (големите пищяли) непосредствено след убиването на животното. Според общоприетата практика клетките се изваждат от бедрените кости или от тибиите, подготвят се и се оцветяват по установените методи. Периферната кръв се взема от опашната вена или друг подходящ кръвоносен съд и незабавно се оцветява суправитално (8) (9) (10), или се приготвят препарати за намазка, след което се оцветяват. Използването на специфични оцветители за ДНК (напр. акридин оранжево (14) или Хьохст 33258 плюс пиронин-Y (15) може да елиминира някои от аретафктите, свързани с използването на оцветител, което не е специфично за ДНК. Това предимство не изключва използването на конвенционални багрила (напр. Гиемса). Могат също да се използват допълнителни системи (напр. целулозни колони за отстраняване на клетки с ядра (16), при условие че е доказано, че тези системи работят адекватно в лабораторното приготвяне на микроядра.

1.5.7. **Анализ**

Пропорцията на незрелите от общо (незрели + зрели) еритроцити се определя за всяко животно, като се отброяват общо най-малко 200 еритроцити за костен мозък и 1 000 еритроцити за периферна кръв (17). Всички предметни стъкла, включително и тези за положителни и отрицателни контроли, следва да се кодират поотделно преди анализа под микроскоп. Най-малко 2 000 незрели еритроцити на животно се изследват за разпространението на незрели еритроцити с микроядра. Допълнителна информация може да се получи чрез изследване на зрели еритроцити за микроядра. Когато се анализират предметни стъкла, пропорцията незрели от общия брой еритроцити не следва да е по-малко от 20 % от контролната стойност. Когато животните се третират непрекъснато в течение на четири или повече седмици, най-малко 2 000 зрели еритроцити на животно могат също да се изследват за разпространението на микроядра. Приемливи алтернативи на ръчния анализ са системите за автоматизиран анализ (анализ на изображението и поточен цитометричен анализ на клетъчни суспензии), ако са подходящо обосновани и валидирани.

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 следва да се дават отделно броят на отчетените незрели еритроцити, броят на незрелите еритроцити с микроядра и броят на незрелите спрямо общото количество на еритроцитите. Когато животните се третират непрекъснато в течение на четири или повече седмици, данни за зрелите еритроцити следва също да се дадат, ако са събрани. Пропорцията на незрелите спрямо общия брой на еритроцитите и, ако се смята за приложимо, процентът на еритроцитите с микроядра, се посочва за всяко животно. Ако няма факти за разлика в реакцията между половете, данните от двата пола могат да се комбинират за статистическия анализ.

▼B

2.2. ОЦЕНКА И ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Има няколко критерия за определяне на положителен резултат, като свързано с дозата увеличение на броя клетки с микроядра или явно увеличение на броя клетки с микроядра в група с еднократна доза и еднократно вземане на проба. Първо следва да се разгледа биологичната значимост на резултатите. При оценката на резултатите от теста като помощно средство може да се използват статистически методи (18) (19). Статистическата значимост не следва да е единственият решаващ фактор за положителна реакция. Двузначните резултати следва да се изяснят чрез допълнително тестване, като за предпочитане е да се изменят условията на експеримента.

Тествано вещество, за което резултатите не отговарят на горните критерии, се смята за немутагенно при 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 в микронуклеарния тест показват, че веществото индуцира микроядра, които са резултат от хромозомно увреждане или увреждане на митотичния апарат в еритробластите на опитния вид. Отрицателните резултати показват, че при условията за провеждане на теста тестваното вещество не създава микроядра в незрелите еритроцити на тестваният вид.

Следва да се обсъди вероятността тестваното вещество или метаболитите му да достигнат общото кръвообращение или конкретно тъканта, която е обект на изследване (напр. системна токсичност).

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.

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, средни стойности и стандартно отклонение за всяка група.

Условия за провеждане на теста:

— положителни и отрицателни (носител/разтворител) контролни данни,

— данни от изследването за установяване на обхват, ако е проведено,

▼B

— основна причина за избора на нивото на дозата,

— подробности за приготвянето на тестваното вещество,

— подробности за администрирането на тестваното вещество,

— основна причина за начина на администриране,

— методи за проверка на достигането на тестваното вещество до общото кръвообращение или прицелната тъкан, ако са приложими,

— 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 графиците на третиране и вземане на проби,

— методи на приготвяне на предметно стъкло,

— методи на измерване на токсичността,

— критерии за отчитане на незрели еритроцити,

— брой на анализирани клетки/животно,

— критерии за отчитане на изследванията като положителни, отрицателни или двузначни.

Резултати:

— признаци на токсичност,

— пропорция на незрелите еритроцити от общия брой еритроцити,

— брой на незрелите еритроцити с микроядра, посочен отделно за всяко животно,

— средна стойност ± стандартно отклонение на незрелите еритроцити с микроядра на група,

— взаимоотношение доза/реакция, където е възможно,

— статистически анализи, ако има такива,

— паралелни отрицателни данни и отрицателни данни от предишни изследвания,

— паралелни положителни контролни данни.

Обсъждане на резултатите.

Заключения.

4. **ПРЕПРАТКИ**

(1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid In Vivo Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.,* 18, pp. 187—190.

(2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.,* 31, pp. 9—15.

(3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.* 123,pp. 61—118.

(4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C, Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The In Vivo Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.,* 239, pp. 29—80.

▼B

(5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N. and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating ErythrocyteS: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, w: *Developments in Science and Practice of Toxicology,* ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya. Elsevier, Amsterdam, pp. 555—558.

(6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A. Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C, Salamone, M. F., Tice, R. R., and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.,* 189, pp. 103—112.

(7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R. and Shelby, M. E. (1990), The in vivo Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 14, pp. 513 —522.

(8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofumi, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.,* 245, pp. 245—249.

(9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridime Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS, MMS, *Mutation Res.,* 278, pp. 83—98.

(10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995), Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis,* 10, pp. 53—159.

(11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchicrotti, F., Romagna, F., Shimada, H. Sutou, S. and Vannier, B. (1994), in Vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.,* 312, pp. 293—304.

(12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral micronucleus test, *Mutagenesis,* 10, pp. 313—319.

(13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in In Vivo Mutagenicity Assays, *Mutagenesis, 7,* pp. 313—319.

(14) Hayashi, M., Sofumi, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.,* 120, pp. 241—247.

(15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyromin Y, *Mutation Res.,* 120, pp. 269—275.

(16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.,* 213, pp. 91—104.

(17) Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.,* 347, pp. 97—99.

▼B

(18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), In Vivo Cytogenetics Assay, w: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity tests, UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part 1, revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115—141.

(19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Staticical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays, w: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184—232.

▼B

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 почувствителни 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.

▼B

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 метаболична активация. Системите *in vitro* за метаболична 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 метаболичната 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 метаболична 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 посее 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), флуктуационният 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 метаболична 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, пиролизидинови 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 плазмиди на R-фактор, при необходимост (т.е. устойчивост на ампицилин в щамовете 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. rfa 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). Щамовете 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 E 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 ß-нафтофлавон (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 по-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 разредят преди третиране на клетките. Течните вещества за теста могат да се добавят директно към системите за тестване и/или да се разредят 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.

▼B

1.5.2. **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 метаболична 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. √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 метаболична активация. Следва да се избират положителните контролни концентрации, показващи ефективно провеждане на всеки опит.

За тестове със система за метаболична 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 метаболична активация:

CAS №	EINECS №	Вещество
781-43-1	212-308-4	9,10-диметилантрацен
57-97-6	200-359-5	7,1 2-диметилбенз[*a*]антрацен
50-32-8	200-028-5	бензо[a]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 метаболична 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 метаболична активация от микрозомни ензими, напр., бензо[a]пирен, диметилбензантрацен.

Следните вещества са примери на специфични по щам положителни контроли за тестове без система за екзогенна метаболична активация:

CAS №	EINECS №	Вещество	Щам
26628-22-8	247-852-1	натриев азид	TA 1535 и TA 100
607-57-8	210-138-5	2-нитрофлуорен	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-амноакридин	TA 1537, TA 97 и TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 и TA 97a
80-15-9	201-254-7	кумол хидроперокисид	TA 102
50-07-7	200-008-6	митомицин C	WP2 uvrA и TA 102
70-25-7	200-730-1	N-етил-N-нитро-N-нитрозо-гуанидин	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 метаболична 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 метаболична активация се смесват обикновено 0,5 ml от сместа за метаболична активация, съдържаща адекватно количество постмитохондрична фракция (в границите от 5 до 30 % v/v в сместа за метаболична 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. Слоят 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 метаболична 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 (третирани 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 метаболична 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 щам със или без система за метаболична 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 метаболична 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.

Заключения.

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.

▼B

Б.15. **ИЗПИТВАНЕ ЗА МУТАГЕННОСТ И ПРЕСЯВАЩО ИЗПИТВАНЕ ЗА КАНЦЕРОГЕННОСТ ГЕННИ МУТАЦИИ — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

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 измерване продукцията на генни мутации, предизвикани от химични агенти със или без метаболитно активиране, могат да се използват разнообразни хаплоидни и диплоидни щамове на дрождите *Saccharomyces cerevisiae.*

Използват се системите за прави мутации в хаплоидни щамове, например измерване на мутацията от червени, аденин зависими мутанти (*ade*-1, *ade*-2) към двойно аденин зависими бели мутанти, и селективни системи, например предизвикване на резистентност към канавнаин и циклохексимид.

Най-широко утвърдената система за обратни мутации включва използването на хаплоидния щам XV 185—14C, който е носител на охра „безсмислени“ мутации *ade* 2—1, *arg* 4—17, *lys* 1—1 и *trp* 5—48, които са обратими от мутагени за заместване на бази, които предизвикват специфични по място мутации или охра потискащи мутации. XV 185—14C е носител и на маркера *his* 1—7, „променяща смисъла“ мутация, която е обратима главно от мутации на друго място, и маркера *horn* 3—10, който е обратим от мутагени, свързани с изместване на рамката.

При диплоидните щамове на *S. cerevisiae* единственият широко използван щам е D_7, който е хомозиготен по *ilv* 1—92.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Подготовка

Разтворите на изпитваните химически вещества следва да бъдат приготвени непосредствено преди изпитването, като се използва подходящ носител. При органични съединения, които не са разтворими във вода, следва да се използва не по-концентриран от 2 % об/об разтвор на органични разтворители, като етанол, ацетон или диметилсулфоксид. Крайната концентрация на носителя не следва да оказва значимо влияние върху клетъчната жизнеспособност и растежните характеристики.

▼B

Метаболитно активиране

Клетките следва да бъдат подложени на експозиция на изпитваните химически вещества както в присъствие, така и в отсъствие на подходяща екзогенна система за метаболитно активиране.

Най-често използваната система е допълнена с ко-фактор митохондриална фракция от черни дробове на гризачи, предварително обработени със средства за ензимна индукция. За метаболитно активиране може да бъде подходящо и използването на други видове, тъкани, постмитоходриални фракции или процедури.

Условия на изпитване

Експериментални щамове

При изпитвания за генни мутации най-широко се използват хаплоидният щам XV185-14C и диплоидният щам D_7. Други щамове също могат да бъдат подходящи.

Среди

За определяне броя на преживелите микроорганизми и на мутантите се използват подходящи среди за култивиране.

Използване на положителни и отрицателни контроли

Паралелно следва да се използват положителни и отрицателни контроли и контроли за разтворителите. За всяка конкретна мутационна крайна точка следва да се използват подходящи химически вещества за положителни контроли.

Експозиционна концентрация

Следва да се използват поне пет концентрации, които са адекватно разделени една от друга. За токсичните вещества най-високата изпитвана концентрация не следва да понижава преживяемостта под 5 до 10 %. Относително неразтворимите във вода вещества следва да се изпитват до границата на разтворимостта им, като се използват подходящи процедури. За лесно разтворимите във вода нетоксични вещества високата концентрация следва да се определя за всеки конкретен случай.

Условия за инкубиране

Петриевите панички се инкубират в продължение на четири до седем дни при 28 до 30 °C на тъмно.

Честоти на спонтанните мутации

Следва да се използват субкултури с честоти на спонтанните мутации в рамките на приетия нормален диапазон.

▼B

Брой на повторенията

За изследване на прототрофи, получени посредством генна мутация, и за изследване на клетъчната жизнеспособност следва да се използват поне по три петриеви панички за всяка концентрация. При експерименти с маркери като *horn* 3—10 с ниска честота на мутациите броят на използваните петриеви панички следва да бъде увеличен, за да се обезпечат статистически значими данни.

Процедура

Третирането на щамовете *S. Cerevisiae* обикновено се извършва в течна среда с клетки в стационарна фаза или фаза на растеж. Първоначалните експерименти следва да се провеждат върху растящи клетки. На експозиция на изпитваното химическо вещество се подлагат $1 – 5 \times 10^7$ клетки/ml в продължение на не повече от 18 часа при 28 до 37 °C, като се разклащат. Когато е необходимо, по време на третирането се добавя адекватно количество система за метаболитно активиране. В края на третирането клетките се центрофугират, промиват се и се посяват върху подходяща среда за култивиране. След инкубиране на петриевите панички се отчитат преживяемостта и предизвикването на генни мутации. Ако първият експеримент е отрицателен, тогава следва да се проведе втори експеримент, като се използват клетки в стационарна фаза. Ако първият експеримент е положителен, това се потвърждава с помощта на подходящ независим експеримент.

2. **ДАННИ**

Данните следва да бъдат представени в табличен вид, като се отбелязват броят на преброените колонии, броят на мутантите, преживяемостта и честотата на мутациите. Всички резултати следва да бъдат потвърдени в независим експеримент. 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 щам,

— условия на изпитването, клетки в стационарна фаза или фаза на растеж, състав на средите, температура и продължителност на инкубирането, система за метаболитно активиране,

— условия на третиране, нива на експозиция, процедура и продължителност на третирането, температура на третиране, положителни и отрицателни контроли,

— брой на преброените колонии, брой на мутантите, преживяемост и честота на мутантите, връзка между доза и отговор, ако е необходимо, статистическа оценка на данните,

— 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.16. **МИТОТИЧНИ РЕКОМБИНАЦИИ — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

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

Митотичната рекомбинация при *Saccharomyces cerevisiae* може да бъде открита между гените (или по-общо, между гена и неговия центромер) и в рамките на отделните гени. Първото явление се нарича кросинговър и води до получаване на реципрочни продукти, докато второто най-често не е реципрочно и се нарича генна конверсия. Кросинговърът обикновено се изследва посредством получаване на рецесивни хомозиготни колонии или сектори в хетерозиготен щам, докато генната конверсия се изследва посредством получаване на прототрофни ревертанти, получени в ауксотрофен хетероалелен щам и носещи два различни дефектни алела на един и същ ген. Най-широко използваните за откриване на митотична генна конверсия щамове са D_4 (хетероалелен по *ade* 2 и *trp* 5), D_7 (хетероалелен по *trp* 5), BZ_{34} (хетероалелен по *arg* 4) и JD1 (хетероалелен по *his* 4 и *trp* 5). Митотичният кросинговър, от който се получават червени и розови хомозиготни сектори, може да се изследва при D_5 или при D_7 (като се измерват и митотичната генна конверсия, и обратната мутация при *ilv* 1—92), като и двата щама са хетероалелни за комплементните алели на *ade 2*.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Подготовка

Разтворите на изпитваните химически вещества и съединенията за сравнение следва да бъдат приготвени непосредствено преди изпитването, като се използва подходящ носител. При органични съединения, които не са разтворими във вода, следва да се използва не по-концентриран от 2 % об/об разтвор на органични разтворители, като етанол, ацетон или диметилсулфоксид. Крайната концентрация на носителя не следва да оказва значимо влияние върху клетъчната жизнеспособност и растежните характеристики.

Метаболитно активиране

Клетките следва да бъдат подложени на експозиция на изпитваните химически вещества както в присъствие, така и в отсъствие на подходяща система за метаболитно активиране. Най-често използваната система е допълнена с ко-фактор митохондриална фракция от черни дробове на гризачи, предварително обработени със средства за ензимна индукция. За метаболитно активиране може да бъде подходящо и използването на други видове, тъкани, постмитохондриални фракции или процедури.

▼B

Условия на изпитване

Експериментални щамове

Най-често използвани са диплоидните щамове D_4, D_5, D_7 и JD1. Може да е целесъобразно използването на други щамове.

Среди

За определяне на преживяемостта и честотата на митотичните рекомбинации се използват подходящи среди за култивиране.

Използване на положителни и отрицателни контроли

Паралелно следва да се използват положителни и отрицателни контроли и контроли за разтворителите. За всяка конкретна рекомбинантна крайна точка следва да се използват подходящи химически вещества за положителни контроли.

Експозиционни концентрации

Следва да се използват поне пет концентрации на изпитваното вещество, които са адекватно разделени една от друга. Сред факторите, които следва да се вземат предвид, са клетъчната токсичност и разтворимостта. Най-ниската концентрация не следва да оказва влияние върху клетъчната жизнеспособност. За токсичните химически вещества най-високата изпитвана концентрация не следва да понижава преживяемостта под 5 до 10 %. Относително неразтворимите във вода химически вещества следва да се изпитват до границата на разтворимостта си, като се използват подходящи процедури. За лесно разтворимите във вода нетоксични вещества високата концентрация следва да се определя за всеки конкретен случай.

Клетките могат да бъдат подложени на експозиция на изпитваните химически вещества в стационарна или растежна фаза за периоди с продължителност до 18 часа. При продължителни периоди на третиране обаче културите следва да бъдат огледани микроскопски за образуване на спори, чието присъствие прави изпитването невалидно.

Условия за инкубиране

Петриевите панички се инкубират на тъмно за четири до седем дни при 28 до 30 °C. Петриевите панички, използвани за изследване на червени и розови хомозиготни сектори, получени посредством митотичен кросинговър, следва да бъдат съхранявани в хладилник (около 4 °C) за допълнителни един до два дни преди отчитането, за да се даде възможност за развитие на съответните пигментирани колонии.

Спонтанни честоти на митотичните рекомбинации

Следва да се използват субкултури с честоти на спонтанните митотични рекомбинантни мутации в рамките на приетия нормален диапазон.

▼B

Брой на повторенията

За изследване на прототрофи, получени посредством генна мутация, и за изследване на клетъчната жизнеспособност следва да се използват поне по три петриеви панички за всяка концентрация. При изпитване на рецесивни хомозиготи, получени посредством митотичен кросинговър, броят на петриевите панички следва да бъде увеличен, за да се осигури адекватен брой колонии.

Процедури

Третирането на щамовете *S. Cerevisiae* обикновено се извършва в течна среда с клетки в стационарна фаза или фаза на растеж. Първоначалните експерименти следва да се провеждат върху растящи клетки. На експозиция на изпитваното химическо вещество се подлагат $1 – 5 \times 10^7$ клетки/ml в продължение на не повече от 18 часа при 28 до 37 °C, като се разклащат. Когато е необходимо, по време на третирането се добавя адекватно количество система за метаболитно активиране.

В края на третирането клетките се центрофугират, промиват се и се посяват върху подходяща среда за култивиране. След инкубиране петриевите панички се отчитат за преживяемост и предизвикване на митотична рекомбинация.

Ако първият експеримент е отрицателен, следва да се проведе втори експеримент, като се използват клетки в стационарна фаза. Ако първият експеримент е положителен, това се потвърждава с помощта на независим експеримент.

2. **ДАННИ**

Данните следва да бъдат представени в табличен вид, като се отбелязват броят на преброените колонии, броят на рекомбинантите, преживяемостта и честотата на рекомбинантите.

Резултатите следва да бъдат потвърдени в независим експеримент.

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 щам,

— условия на изпитването, клетки в стационарна фаза или фаза на растеж, състав на средите, температура и продължителност на инкубирането, система за метаболитно активиране,

— условия на третиране, експозиционна концентрация, процедура и продължителност на третирането, температура на третиране, положителни и отрицателни контролни групи,

— брой на преброените колонии, брой на рекомбинантите, преживяемост и честота на рекомбинациите, ако е необходимо, връзка между доза и отговор, статистическа оценка на данните,

— 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.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 ОИСР 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 TK6 на човешки лимфобластоидни клетки (1). В тези клетъчни линии най-често използваните генетични крайни точки измерват мутацията на киназата на тимидина (TK) и трансферазата на хипоксантин-гуанин фосфорибозил (HPRT), както и трансген от трансферазата на ксантин-гуанин фосфорибозил (XPRT). Тестовете за мутации на TK, HPRT и XPRT откриват различни спектри на генетични събития. Автозомното разполагане на TK и XPRT може да даде възможност за откриването на генетични събития (напр. големи делеции), които не се забелязват на локуса на HPRT 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.

Тестовете *in vitro* по принцип изискват екзогенен източник на метаболична активация. Тази система за метаболична активация не може изпяло 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 pH, 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 кодирания 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 $ТК^{+/-} \rightarrow ТК^{-/-}$ са устойчиви на цитотоскичните ефекти на пиримидиновия аналог трифлуороитимидин (TFT). Клетките с изобилие от тимидин киназа са чувствителни към TFT, което причинява инхибиране на клетъчния метаболизъм и спира по-нататъшното клетъчно деление. Така мутантните клетки са способни да пролиферират в присъствието на TFT, докато нормални клетки, съдържащи тимидин киназа, не са. Аналогично, клетките с дефицит от HPRT или XPRT се избират според устойчивостта им към 6-тиогуанин (TG) или 8-азагуанин (AC). Следва внимателно да се подходи към свойствата на тестваното вещество, ако базов аналог или съединение се тестват в някой от тестовете 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 метаболична 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 колониите се преброяват. Мутантната честота се получава от броя на мутантни колонии в селективна среда и броя на колониите 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 (носители 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 ºC. 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 ко-фактор, приготвена от черните дробове на гризачи, третирани с ензимно индуциращи реактиви, като Ароклор 1254 (15) (16) (17) (18) или смес от фенобарбитон и ß-нафтофлавон (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 разредят преди третиране на клетките. Течните вещества за теста могат да се добавят директно или да се разредят 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*

Измежду критериите, които следва да се имат предвид при определянето на най-високите концентрации, са цитотоксичността, разтворимостта в тестовата система и промените в pH или осмотичното налягане.

Цитотоксичността следва да се определи със и без метаболична 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 метаболична активация, следва да се включат във всеки експеримент. Когато се използва метаболична 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 метаболична активация	Локус	Вещество	CAS №	Einecs №
Отсъствие на екзогенна метаболична активация	HPRT	Етил метансулфонат	62-50-0	200-536-7
		Етил нитрозокарбамид	759-73-9	212-072-2
	ТК (малки и големи колонии)	Метил метансулфонат	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Етил метансулфонат	62-50-0	200-536-7
		Етил нитрозокарбамид	759-73-9	212-072-2
Наличие на екзогенна метаболична активация	HPRT	3-метилхолантрен	56-49-5	200-276-4
		]N-нитрозодиметиламин	62-75-9	200-549-8
		7,12-диметилбензантрацен	57-97-6	200-359-5
	ТК (малки и големи колонии)	Циклофосфамид	50-18-0	200-015-4
		Циклофосфамид монохидрат	6055-19-2	
		Бензо[*a*]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[*a*]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 рефрентно 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 третирани 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 метаболична 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 колониите 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 колониите следва да се извърши на отрицателните и положителните контроли. В изследвания, използващи ТК6$TK^{+/-}$, може също да се направи сортиране на колониите.

▼B

2. **ДАННИ**

2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Данните следва да обхващат цитотоксичността и жизнеспособността, броя на колониите и честотите на мутантите за третираните и контролни култури. В случай на положителна реакция в теста L5178Y $TK^{+/-}$ колониите 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 $TK^{+/-}$ колониите 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). Помалко 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. Двузначните 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 двузначните или отрицателните резултати. Параметрите на изследването, които биха могли да се изменят, обхващат границите на концентрацията и условията на метаболична 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, CO_2 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 метаболична 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 колониите са взети предвид (в т.ч. критерии за „малки“ и „големи“ колонии, както е уместно).

Резултати:

— признаци на токсичност,

— признаци на утаяване,

— данни за pH и осмотичното налягане по време на експозицията към тестваното вещество, ако са определени,

— размер на колониите, 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 Methanosulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — 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 Mazzaccoro, 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 Polycholrinated 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 Trifluoronthymidine, 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.

▼B

Б.18. УВРЕЖДАНЕ И РЕПАРАЦИЯ НА ДНК — НЕПЛАНИРАН СИНТЕЗ НА ДНК — КЛЕТКИ ОТ БОЗАЙНИЦИ (*IN VITRO*)

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 непланиран синтез на ДНК (UDS) измерва синтеза за репарация на ДНК след изрязване и отстраняване на последователност от ДНК, която съдържа участъка с повреда, предизвикана от химични или физични агенти. Изпитването се базира на включването на маркиран с тритий тимидин ^{3}H-TdR) в ДНК на клетки от бозайници, които не са във фаза S на клетъчния цикъл. Навлизането на ^{3}H-TdR може да бъде определено с помощта на авторадиография или посредством течно сцинтилационно броене (LSC) на ДНК от третираните клетки. Културата на клетките от бозайници, освен ако не се използват първични хепатоцити от плъх, се третира с изпитвания агент със и без екзогенна система за метаболитно активиране. UDS може да се измерва и в *in vivo* системи.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Подготовка

Изпитваните химически вещества и веществата за сравнение следва да бъдат приготвени в средата за растеж или разтворени или суспендирани в подходящи носители и после да бъдат разредени допълнително в средата за растеж, която се използва при изпитването. Крайната концентрация на носителя не следва да оказва влияние върху жизнеспособността на клетките.

При изпитването могат да се използват първични култури от хепатоцити на плъх, човешки лимфоцити или постоянни клетъчни линии (например човешки диплоидни фибробласти).

Клетките следва да бъдат подложени на експозиция на изпитваното химическо вещество както в присъствие, така и в отсъствие на подходяща система за метаболитно активиране.

Условия на изпитване

Брой на културите

За всяка експериментална точка са необходими поне две клетъчни култури за авторадиография и шест култури (или по-малко, ако е научно оправдано) за LSC UDS изпитвания.

▼B

Използване на положителни и отрицателни контроли

Във всеки експеримент следва да бъдат включени паралелни положителни и отрицателни (нетретирани и/или с носител) контроли със и без метаболитно активиране.

Примери за положителни контроли за изследване на хепатоцити от плъх са 7,12-диметилбензантрацен (7,12-DMBA) или 2-ацетиламинофлуорен (2-AAF). При постоянни клетъчни линии пример за положителна контрола е 4-нитроквинолин-N-оксид (4-NQO), както за авторадиографски, така и за LSC изследвания, проведени без метаболитно активиране. N-диметилнитрозаминът представлява пример за положително контролно съединение, когато се използват системи за метаболитно активиране.

Експозиционни концентрации

Следва да се използват множество концентрации на изпитваното вещество в диапазон, който е адекватен за определяне на отговора. Най-високата концентрация следва да предизвиква известни токсични за клетката ефекти. Относително неразтворимите във вода съединения следва да се изпитват до границата на разтворимостта си. За лесно разтворимите във вода нетоксични химически вещества високата концентрация на изпитваните химически вещества следва да се определя за всеки конкретен случай.

Клетки

При поддържане на културите следва да се използват подходящи среди за растеж, концентрация на CO_2, температура и влажност. Постоянните клетъчни линии следва да се проверяват периодично за заразяване с *Mycoplasma.*

Метаболитно активиране

При първични култури от хепатоцити не се използват системи за метаболитно активиране. Постоянните клетъчни линии и лимфоцитите се подлагат на експозиция на изпитваното вещество както в присъствие, така и при липса на подходяща система за метаболитно активиране.

Процедура

Приготвяне на култури

Постоянните клетъчни култури се получават от изходни култури (например чрез трипсинизация или отделяне), посети в съдове за култивиране при подходяща плътност и инкубирани при 37 °C.

Краткотрайните култури от хепатоцити на плъх се създават чрез даване възможност на прясно дисоциирани в подходяща среда хепатоцити да се закрепят към растежната повърхност.

Култури от човешки хепатоцити се създават с помощта на подходящи техники.

▼B

Третиране на културите с изпитваното вещество

Първични хепатоцити от плъх

Прясно изолирани хепатоцити от плъх се третират с изпитваното вещество в среда, съдържаща ^{3}H-TdR, в продължение на подходящ по продължителност период от време. В края на третирането от средата се отстраняват клетките, които след това се измиват, фиксират и изсушават. Предметните стъкла се потопяват в авторадиографска емулсия (алтернативно може да се използва филм с отлепващ се слой), експонират се, проявяват се, оцветяват се и се преброяват.

Постоянни клетъчни линии и лимфоцити

Авторадиографски техники: Клетъчните култури се подлагат на експозиция на изпитваното вещество за периоди с подходяща продължителност, последвани от третиране с ^{3}H-TdR. Времената зависят от естеството на веществото, активността на метаболизиращите системи и типа клетки. За да се открият пиковете на UDS, ^{3}H-TdR следва да бъде добавен едновременно с изпитваното вещество или в рамките на няколко минути след експозицията на изпитваното вещество. Изборът между тези две процедури ще зависи от възможните взаимодействия между изпитваното вещество и ^{3}H-TdR. За да се направи разлика между UDS и полуконсервативната репликация на ДНК, последната следва да бъде потисната, например чрез използване на среда с дефицит на аргинин, ниско съдържание на серум или чрез хидроксиурея към средата за култивиране.

LSC измервания на UDS: Преди третиране с изпитваното вещество навлизането на клетки в S- фазата следва да бъде блокирано, както е описано по-горе. След това клетките следва да бъдат подложени на експозиция на изпитваното химическо вещество, както е описано при авторадиографията. В края на инкубирането ДНК следва да бъде извлечена от клетките и следва да се определят общото съдържание на ДНК и степента на включване на ^{3}H-TdR.

Следва да се отбележи, че когото при горепосочените техники се използват човешки лимфоцити, потискането на полуконсервативната репликация на ДНК в нестимулирани култури не е необходимо.

Анализ

Авторадиографски изследвания

При определяне на UDS в клетки от култура не се броят ядрата във фаза S. Следва да се преброят поне по 50 клетки от всяка концентрация. Преди преброяването предметните стъкла следва да бъдат кодирани. На всяко предметно стъкло следва да се преброят по няколко разделени на голямо разстояние едно от друго случайни полета. Количеството на включения в цитоплазмата ^{3}H-TdR следва да бъде определено посредством преброяване на три цитоплазмени полета с размер колкото ядро от всяка преброена клетка.

Измервания с LSC

При всяка концентрация и при контролите за изследване на непланирания синтез на ДНК чрез измервания с LSC следва да се използва адекватен брой култури.

▼B

Всички резултати следва да бъдат потвърдени в независим експеримент.

2. **ДАННИ**

Данните следва да бъдат представени в табличен вид.

2.1. АВТОРАДИОГРАФСКИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Степента на включване на ^{3}H-TdR в цитоплазмата и броят на гранулите, открити в клетъчното ядро, следва да бъдат регистрирани поотделно.

За да се опише разпределението на степента на включване на ^{3}H-TdR в цитоплазмата и броя на гранулите за ядро, може да се използват средната стойност и стойностите на медианата и модата.

2.2. ИЗМЕРВАНИЯ С LSC

За измерванията с LSC включването на ^{3}H-TdR следва да се отчита като dpm/μg ДНК. Средната стойност на dpm/μg ДНК със стандартното отклонение може да се използват за описване на разпределението на включването.

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:

— използваните клетки, плътността и броя на пасажите при третирането, броя на клетъчните култури,

— методите, използвани за поддържане на клетъчните култури, включително средата, температурата и концентрациите на CO_2,

— изпитваното вещество, носителя, концентрациите и обосновката за избор на концентрации, използвани при изпитването,

— подробности за системите за метаболитно активиране,

— схема на третирането,

— положителни и отрицателни контроли,

— използваната авторадиографска техника,

— процедурите, използвани за блокиране влизането на клетките в S-фаза,

— процедурите, използвани за извличане на ДНК и за определяне на общото съдържание на ДНК при измерването с LSC,

— когато е възможно, връзката доза/отговор,

— 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.19. **ИЗПИТВАНЕ *IN VITRO* ЗА ОБМЕНИ НА СЕСТРИНСКИ ХРОМАТИДИ**

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 обмени на сестрински хроматиди (SCE) представлява краткотрайно изпитване за откриване на реципрочни обмени на ДНК между две сестрински хроматиди в удвояваща се хромозома. SCE представляват обмена на продукти от репликацията на ДНК в предполагаеми хомоложни локуси. Предполага се, че процесът на обмен включва разкъсване и след това повторно съединяване на ДНК, въпреки че е известно малко за молекулната му основа. Откриването на SCE изисква средство за диференциално маркиране на сестринските хроматиди и това може да бъде постигнато посредством включване на бромодеоксиуридин (BrdU) за два клетъчни цикъла в хромозомната ДНК.

Клетките на бозайниците се подлагат *in vitro* на експозиция на изпитваното химическо вещество със и без екзогенна система за метаболитно активиране на при бозайници, ако е необходимо, и се култивират в продължение на два цикъла на репликация в среда, съдържаща BrdU. След третиране на клетките със средство, потискащо делителното вретено (например колхицин), за да се натрупат клетки в подобен на метафаза етап от митозата (с-метафаза), те се отлепват и от хромозомите се приготвят препарати.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Подготовка

— При изпитването могат да се използват първични култури, (човешки лимфоцити) или постоянни клетъчни линии (например яйчникови клетки от китайски хамстер). Клетъчните линии трябва да се проверяват за заразяване с *Mycoplasma.*

— Трябва да се използват подходящи среди за култивиране и условия за инкубиране (т.е. температура, съдове за култивиране, концентрации на CO_2 и влажност).

— 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 значително влияние върху жизнеспособността или скоростта на растеж на клетките и ефектите върху честотата на обмена на сестрински хроматиди трябва да бъде мониториран посредством контрол за разтворителя.

▼B

— Клетките трябва да бъдат подложени на експозиция на изпитваното вещество както в присъствие, така и в отсъствие на екзогенна система за метаболитно активиране при бозайници. Алтернативно, когато се използват клетки с вътрешна метаболитна активност, скоростта и естеството на активността трябва да бъдат подходящи за изпитвания клас химически вещества.

Условия на изпитване

Брой на културите

За всяка експериментална точка трябва да се използват най-малко по две култури.

Използване на положителни и отрицателни 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 контроли за носителя.

Следват примери за вещества, които могат да бъдат използвани като положителни контроли:

— съединение с пряко действие:

  — етилметансулфонат,

— съединение с непряко действие:

  — циклофосфамид.

Когато е целесъобразно, може да се включи допълнителна положителна контрола със същия клас химически вещества, както изпитваното.

Експозиционни концентрации

Трябва да се използват поне три концентрации, които са адекватно разделени една от друга. Най-високата концентрация трябва да предизвиква значителен токсичен ефект, но все пак трябва да дава възможност за осъществяването на адекватна клетъчна репликация. Относително неразтворимите във вода вещества трябва да се изследват до границата на разтворимостта си, като се използват подходящи процедури. За лесно разтворимите във вода нетоксични вещества високата изпитвана концентрация трябва да се определя за всеки конкретен случай.

Процедура

Приготвяне на култури

Постоянните клетъчни култури се получават от изходни култури (например чрез трипсинизиране или отделяне), посети в съдове за култивиране при подходяща плътност и инкубирани при 37 °C. За еднослойните култури броят на клетките за съд за култивиране трябва да бъде коригиран така, че културите да не се сливат над 50 % в момента на отлепват. Алтернативно, клетките могат да бъдат използвани в суспензионна култура. Културите от човешки лимфоцити се получават от хепаринизирана кръв, като се използват подходящи техники и се инкубират при 37 °C.

▼B

Третиране

Клетките в експоненциален стадий на растеж се подлагат на експозиция на изпитваното вещество за период с подходяща продължителност. В повечето случаи един до два часа могат да бъдат ефективни, но в определени случаи продължителността на третирането може да бъде удължена до два пълни клетъчни цикъла. Клетките без достатъчна вътрешна метаболитна активност трябва да бъдат подложени на експозиция на изпитваното химическо вещество както в присъствие, така и в отсъствие на подходяща система за метаболитно активиране. В края на експозицията клетките се измиват напълно от изпитваното вещество и се култивират в продължение на два цикъла на репликация в присъствието на BrdU. Като алтернативна процедура клетките могат да бъдат подложени на експозиция едновременно на изпитваното химическо вещество и на BrdU в продължение на пълното време на култивиране на два клетъчни цикъла.

Културите от човешки лимфоцити се третират, когато се намират в полусинхронно състояние

Клетките се анализират при второто им деление след третирането, като най-чувствителните етапи от клетъчния цикъл трябва да бъдат подложени на експозиция на химическото вещество. С всички култури, към които се добавя BrdU, трябва да се работи на тъмно или при матова светлина от лампи с нажежени жички до отлепването на клетките, за да се намали до минимум фотолизата на съдържащата BrdU ДНК.

Отлепване на клетки

Клетъчните култури се третират с инхибитори на делителното вретено (например колхицин) един до четири часа преди отлепването. Всяка култура се отлепва и обработва поотделно за приготвяне на хромозоми.

Приготвяне и оцветяване на хромозоми

Хромозомните препарати се приготвят с помощта на стандартни цитогенетични техники. Оцветяването на предметните стъкла, за да се демонстрират SCEs може да се направи с помощта на няколко техники (например метод с флуоресценция плюс Giemsa).

Анализ

Броят на анализираните клетки трябва да се базира на спонтанната честота на SCE в контролата. Обикновено за SCEs се анализират най-малко 25 добре разгърнати метафази за култура. Преди анализа предметните стъкла се кодират. При човешки лимфоцити се анализират само метафази, които съдържат 46 центромера. При постоянни клетъчни линии се анализират само метафази, които съдържат ± 2 от модалния брой. Трябва да се посочи дали центромерното превключване на маркера се брои за SCE или не. Резултатите трябва да бъдат потвърдени в независим експеримент.

2. **ДАННИ**

Данните трябва да бъдат представени в табличен вид. За всички третирани и контролни култури поотделно трябва да се дадат броят на обмените на сестрински хроматиди във всяка метафаза и броят на обмените на сестрински хроматиди за хромозома във всяка метафаза.

Данните трябва да бъдат оценени с помощта на подходящи статистически методи.

▼B

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Ако е възможно, протоколът от изпитването съдържа следната информация:

— използваните клетки, методите за поддържане на клетъчната култура,

— условия на изпитване: състав на средите, концентрация на CO_2, концентрация на изпитваното вещество, използван носител, температура на инкубиране, продължителност на третирането, използван инхибитор на делителното вретено, неговата концентрация и продължителността на третирането с него, тип на използваната система за метаболитно активиране, положителни и отрицателни контроли,

— брой на клетъчните култури за една експериментална точка,

— подробности за техниката, използвана за приготвяне на предметни стъкла,

— брой на анализираните метафази (данните се дават поотделно за всяка култура),

— среден брой SCE за клетка и за хромозома (данните се дават поотделно за всяка култура),

— критерии за отчитане на SCE,

— обосновка за избора на доза,

— когато е необходимо, връзката доза/отговор,

— 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.20. **ИЗПИТВАНЕ ЗА ПОЛОВО СВЪРЗАНА РЕЦЕСИВНА ЛЕТАЛНОСТ ПРИ *DROSOPHILA MELANOGASTER***

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. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Изпитването за полово свързана леталност (SLRL) при *Drosophila me1anogaster* открива появата на мутации, точкови мутации и малки делеции в зародишната линия на насекомото. Това изпитване представлява метод за изследване за прави мутации, с който може да се направи пресяващо изпитване за мутации при около 800 локуса в Х-хромозомата, като това представлява около 80 % от всички локуси в Х-хромозомата. Х-хромозомата представлява около една пета от целия хаплоиден геном.

Мутациите в Х-хромозомата на *Drosophila me1anogaster* са фенотипно изявени при мъжките индивиди, които са носители на мутантния ген. Когато мутацията е летална в хомозиготно състояние, за присъствието ѝ се съди по липсата на единия от двата класа мъжко потомство, които нормално се получават от хетерозиготно женско насекомо. При изпитването SLRL се използват тези факти с помощта на специално маркирани и подредени хромозоми.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Подготовка

Източници

Могат да се използват мъжки насекоми от добре дефинирани източници на насекоми от див тип и женски от източник на вида Muller-5. Могат да се използват и други съответно маркирани източници на женски насекоми с множество инвертирани Х-хромозоми.

Изпитвано вещество

Изпитваните вещества трябва да бъдат разтворени във вода. Веществата, които са неразтворими във вода, могат да бъдат разтворени или суспендирани в подходящи носители (например смес от етанол и Tween-60 или 80), а след това да бъдат разтворени във вода или физиологичен разтвор преди прилагането. Трябва да се избягва използването на диметилсулфоксид като носител.

▼B

Брой на животните

Изпитването трябва да бъде проектирано с предварително определена чувствителност и възможности. Наблюдаваната честота на спонтанните мутации при съответната контрола ще окаже силно влияние върху броя на третираните хромозоми, които трябва да бъдат анализирани.

Начин на прилагане

Експозицията може да бъде орална, чрез инжектиране или чрез експозиция на газове или пари. Подхранване с изпитваното вещество може да се направи със захарен разтвор. Когато е необходимо, веществата могат да бъдат разтворени в 0,7 % разтвор на NaCl и да бъдат инжектирани в гръдния кош или корема.

Използване на отрицателни и положителни контроли

Трябва да бъдат включени отрицателни (за носителя) и положителни контроли. Обаче ако съществуват подходящи исторически контролни данни, паралелни контроли не са необходими.

Нива на експозиция

Трябва да се използват три нива на експозиция. За предварителна оценка може да се използва едно ниво на експозиция на изпитваното вещество, като това ниво представлява максималната поносима концентрация или нивото, което води до някакви признаци на токсичност. За нетоксичните вещества, трябва да се използва експозиция на максималната възможна концентрация.

Процедура

Мъжките насекоми див тип (на възраст три до пет дни) се третират с изпитваното вещество и се чифтосват поотделно с по-голям брой девствени женски насекоми от вида Muller-5 или от друг подходящо маркиран (с множество инвертирани Х-хромозоми) вид. Женските се заместват с нови девствени женски насекоми на всеки два до три дни, за да се покрие целият цикъл на зародишните клетки. Потомството на тези женски се оценява за леталност, съответстваща на ефектите върху зрялата сперма, сперматидите от средна или късна фаза, ранните сперматиди, сперматоцитите и сперматогониите по време на третирането.

Хетерозиготните женски насекоми от поколението F_1 от горните кръстосвания се чифтосват поотделно (т.е. една женска за флакон) със своите братя. В поколението F_2 всяка култура се отчита за липса на мъжки насекоми от див тип. Ако изглежда, че една култура е възникнала от женско насекомо от поколение F_1, което носи летален признак в родителската Х-хромозома (т.е. не се наблюдават мъжки насекоми с третираната хромозома), дъщерите на тази женска със същия генотип трябва да бъдат изследвани, за да се уверим, че леталният признак се повтаря в следващото поколение.

2. **ДАННИ**

Данните трябва да бъдат представени в табличен вид, за да бъде показан броят на изследваните Х-хромозоми, броят на безплодните мъжки насекоми и броят на хромозомите с летален признак при всяка експозиционна концентрация и за всяко чифтосване на всяко третирано мъжко насекомо. Трябва да бъде даден броят на клъстерите. Тези резултати трябва да бъдат потвърдени в отделен експеримент.

▼B

За оценка на изпитванията за полово свързана леталност трябва да се използват подходящи статистически методи. Образуването на клъстери от рецесивни летални признаци, произхождащи от едно мъжко насекомо, трябва да се вземат предвид и да се оценят с подходящ статистически метод.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Ако е възможно, протоколът от изпитването съдържа следната информация:

— източник: използваните източници/видове и породи *Drosophila,* възрастта на насекомите, броят на третираните мъжки насекоми, броят на стерилните мъжки насекоми, броят на постоянните култури от поколение F_2, броят на културите F_2 без потомство, броят на хромозомите, носещи летален признак, открити на всеки стадий от развитието на зародишните клетки,

— критериите за определяне размера на третираните групи,

— условия на изпитване: подробно описание на схемата за третиране и вземане на проби, нивата на експозиция, данните за токсичността, ако е необходимо, отрицателните (за разтворителя) и положителните контроли,

— критерии за отчитане на леталните мутации,

— връзката контакт/ефект, когато е възможно,

— оценка на данните,

— 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.21. **ИЗПИТВАНИЯ *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 C3H10$T_{1/2}$, 3T3, SHE, плъх на Fisher и при изпитванията се разчита на измененията в клетъчната морфология, образуването на огнища и закрепването в полутвърд агар. Съществуват по-рядко използвани системи, които откриват други физиологични и морфологични изменения в клетките след експозиция на канцерогенни химически вещества. Никоя 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. Изследователят 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 изследователя 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 трансформациите 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 третирани, 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 прясно 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 третираните 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 пожертват 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 пожертване,

— 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 хоромозомен 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 третираните 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 третираните 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 тестваното 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 хроматида на една и съща страна.

Празнина: ахроматично увреждане, по-малко от ширината на един хроматид с минимално отклонение в реда на хроматида(ите).

Геномна аберация: промяна в броя на хромозоми в сравнение с нормалния брой, характерен за използваните животни.

Полиплоидия: множимо на хаплоидния брой хромозоми (*n*), различно от диплоидния брой (т.е. 3*n*, 4*n* 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 Колцемид®). 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 теглото на животните следва да са минимални и да не превишават ± 20 % от средното тегло.

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 идентифакация. Животните се аклиматизират към лабораторните условия поне пет дни преди началото на изследването.

▼B

1.4.1.4. *Приготвяне на дози*

Твърдите вещества за теста следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители и, ако следва, да се разредят преди даване на дозата на животните. Течните вещества за теста могат да се дават директно или да се разредят 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/носителят 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 циклофосфамид монохидрат	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Циклохексамин	108-91-8	203-629-0
Митомицин C	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 третирания). Тестваните вещества могат също да се администрират като разделена доза, т.е. две третирания 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 ранно 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).

Доколко 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 третирания 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 изостряни 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 хромозомите**

Незабавно след убиване на животните от един или двата тестиса се приготвят клетъчни суспензии, експонират се на хипотоночен 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 делящи клетки на животно, 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 животно.

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. Двузначните 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 графиците 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.

Заключения.

▼B

4. **ПРЕПРАТКИ**

(1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C, Lambert B., and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York, pp. 477—484.

(2) Adler, I. D. (1984), Cytogenic tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275—306.

(3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, Cytogenetics and Cell Genetics, 3, pp. 289—294.

(4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson L. (1990), In Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115—141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, Mutation Res., 52, pp. 207—209.

(6) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, Mutation Res., 312, pp. 313—318.

(7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 313—319.

(8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184—232.

▼B

Б.24. **ИЗПИТВАНЕ ЗА ПЕТНА ПО КОЗИНАТА 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

Това е изпитване *in vivo* върху мишки, при който развиващите се зародиши се подлагат на експозиция на химически вещества. Целевите клетки в развиващите се зародиши са меланобластите, а целевите гени са тези, които контролират пигментирането на космите на козината. Развиващите се зародиши са хетерозиготни по много от тези гени за цвета на козината. Една мутация в доминантния алел или загуба на доминантния алел на такъв ген в меланобластна клетка (причинени от разнообразни генетични събития) водят до изява на рецесивния фенотип в клетките потомци, което се изразява в петно с променен цвят по козината на получената мишка. Оценява се броят на потомството с такива петна (т.е. мутации) и честотата им се сравнява с тази сред поколението, получено от зародиши, които са третирани само с разтворител. Изпитването за петна по козината при мишки открива предполагаеми соматични мутации във феталните клетки.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Няма.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Подготовка

Когато е възможно, изпитваните вещества трябва 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 трябва да оказва влияние върху изпитваното химическо вещество, нито да предизвиква токсични ефекти. Трябва да се използват прясно приготвени препарати от изпитваните химически вещества.

Експериментални животни

Мишки от породата T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, c^{ch} p/c^{ch}p; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) са чифтосани с породата HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe) или C57BL (nonagouti, a/a). Могат да се използват други подходящи кръстоски, например между NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) и DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute d/d), при условия че от тях се получава потомство неагути.

▼B

Брой и пол

Третират се достатъчно на брой бременни женски индивиди, за да се получи подходящ брой преживяващо поколение за всяко използвано ниво на дозиране. Подходящата големина на извадката зависи от броя на наблюдаваните петна при третираните мишки и от количеството контролни данни. Отрицателният резултат е приемлив само ако се оценяват най-малко 300 индивида от потомството на женските животни, третирани с най-високата доза.

Използване на отрицателни и положителни контроли

Трябва да има паралелни контролни данни от мишки, третирани само с носител (отрицателни контроли). От историческите контролни данни от същата лаборатория може да се направи пул, за да се повиши чувствителността на изпитването, при условие че тези данни са хомогенни. Ако не бъде открита мутагенност на изпитваното химическо вещество, трябва да съществуват новополучени положителни контролни данни за третиране с химическо вещество, за което е известно, че при това изпитване демонстрира мутагенност, от същата лаборатория.

Начин на прилагане

Обичайните начини на прилагане са чрез орално интубиране или интрапериотонеално инжектиране при бременните женски индивиди. Когато е целесъобразно, се използват третиране чрез инхалиране или други начини на прилагане.

Нива на дозиране

Използват се най-малко две нива на дозиране, включително едно, при което се наблюдават признаци на токсичност или намалена големина на котилото. За нетоксичните вещества трябва да се използва експозиция на максималната възможна доза.

Процедура

Нормално се провежда единично третиране на ден 8,9 или 10 от бременността, като за ден 1 се брои денят, на който за първи път се наблюдава вагинална запушалка. Тези дни съответстват на дни 7,25, 8,25 и 9,25 след зачеването. През тези дни може да се използва последователно третиране.

Анализ

Потомството се кодира и изследва за петна между три и четири седмици след раждането. Различават се три класа петна:

а) бели петна на разстояние до 5 мм от средната коремна линия (WMVS), за които се смята, че се дължат на убийство на клетки;

б) жълти, подобни на агути, петна, асоциирани с гръдните жлези, гениталиите, гърлото, аксиларните и ингвиналните области и по средата на челото, за които се смята, че се дължат на нарушена диференциация (MDS), и

в) пигментирани и бели петна, случайно разпръснати по козината, за които се смята, че се дължат на соматични мутации (RS).

▼B

Отчитат се всичките три класа, но само един от тях, последният RS, има генетично значение. Проблемите с разграничаването между MDS и RS могат да бъдат разрешени с помощта на флуоресцентна микроскопия на проби от косми.

Трябва да се отбележат очевидните макроскопски аномалии при потомството.

2. **ДАННИ**

Данните се представят като общ брой на проследяваното потомство и брой на индивидите с едно или повече петна, за които се предполага, че се дължат на соматични мутации. Данните от третираните групи и отрицателните контроли се сравняват с помощта на подходящи методи. Данните се представят и за отделно котило.

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Ако е възможно, протоколът от изпитването съдържа следната информация:

— породите, използвани при кръстосването,

— броят бременни женски животни в експерименталната и контролната група,

— средната големина на котилото в експерименталната и контролната група при раждането и при отбиването,

— нивото(ата) на дозиране на изпитваното химическо вещество,

— използваният разтворител,

— денят от бременността, на който е извършено третирането,

— начинът на третиране,

— общият брой проследявано потомство и броят на животните с WMVS, MDS и RS в експерименталните и контролните групи,

— микроскопските морфологични аномалии,

— когато е възможно, връзката доза/отговор за RS,

— 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.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 Х-хромозоми. Носителите на транслокации и женските индивиди с ХО-генотип демонстрират намалена плодовитост, която се използва за селекция на потомство от поколение F_1 за цитогенетичен анализ. Пълно безплодие се причинява от определени типове транслокации (Х-автозомни и с-t-тип). Транслокациите се наблюдават цитогенетично в мейотичните клетки в метафаза I на диакинезата при мъжките индивиди от поколение F_1, или мъжкото потомство на женските от поколение F_1. Женските с ХО-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 прясно 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.

а) 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 XO-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 XO-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 (c-t-тип). Някои X-автозомни 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 XO-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 селекционират 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 ОИСР 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 индентификация 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 абревиатура 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 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.

▼B

1.4.3.3. *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 групи 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.

▼B

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 третирани 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 заболеваемост 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 и минимална. Забелязаните признаци следва да включват, но не и да се ограничават само с: изменения в кожата, козината, очите, лигавиците, появяване на секреции и екскреция и органична независима активност (например лакримация, пилоерекция, 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 проприоцептични 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 процедурата по умъртвяване на животните (като част от тези, които са намерени умиращи и/или междувременно 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 въздействия (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, pH, 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, паратироид, 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-високо 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 абревиатура 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 отгледаните 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 заболеваемост 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 държание (например самоосакатяване, вървене назад).

Преди приемането на изследваното веществото 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 тромбопластиново 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 траспептидаза, 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, pH, 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, метамоглобин 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 полепналите 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 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), 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 тестваното 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. 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, 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.

Заключения.

▼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 ± 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.

▼B

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.

▼B

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, тромбопластиново 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 трансаминаза ([1]), серумна глутамат оксалоацетат трансаминаза ([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, пялата 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 характеризиране на токсичността на даден изпитван химикал.

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоен на Указание за изпитване 413 на ОИСР (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. Разредени 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 ± 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 механистично 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, лактатдехидрогеназа 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

▼M4

обаче изисква аналитични данни, които доказват, че съставът на намиращия се във въздуха материал е подобен на този на изходния материал. Ако тази информация не е налична, може да е необходимо извършване на анализ на изпитвания химикал (в идеалния случай в състоянието, в което е разтворен във въздуха), повтарящо се на редовни интервали по време на изследването. За агенти в аерозолна форма, които могат да се изпаряват или да сублимират, следва да се покаже, че всички фази са събрани по избрания метод.

26. По възможност за времетраенето на изследването следва да се използва една партида от изпитвания химикал, като изпитваната проба следва да се съхранява при условия, при които се поддържат нейната чистота, хомогенност и устойчивост. Преди началото на изследването следва да се направи охарактеризиране на изпитвания химикал, включително неговата чистота и, ако е технически осъществимо, идентичността, както и количествата на идентифицираните замърсители и примеси. Това може да бъде доказано от, но не се ограничава до, следните данни: време на задържане и относителна площ на пика, получена чрез масспектрометрия 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 въглеводороди (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 ± 10 % за газовете и парите или ± 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 поглътител 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. 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).

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, лактатдехидрогеназа, сорбиталдехидрогеназа, глутамат-дехидрогеназа, и гама-глутамилтранспептидаза).

Таблица 1

Стандартни параметри на клиничната патология

Хематология	
Брой на еритроцитите	Общ брой на левкоцитите
Хематокрит	Диференциален брой на левкоцити
Концентрация на хемоглобина	Брой на тромбоцитите
Средно съдържание на хемоглобин	Потенциал за съсирване (изберете едно от посочените):
Среден обем на еритроцитите	— протромбиново време
Средна концентрация на хемоглобин в еритроцитите	— време за съсирване
Ретикулоцити	— частично тромбопластиново време
Клинична химия	
Глюкоза (*)	Аланинаминотрансфераза
Общ холестерол	Аспартатаминотрансфераза
Триглицериди	Алкална фосфатаза
Азот в кръвна уреа	Калий
Общ билирубин	Натрий
Креатинин	Калций
Общо белтъци	Фосфор
Албумин	Хлорид
Глобулин	
Изследвания на урина (незадължителни)	
Външен вид (цвят 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 увреждания 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).

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 консервивани 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 % буфериран 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	Околощитовидни жлези
Колон	Периферен нерв (седалищен или голямопищялен, 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
[Слъзни жлези (клепачни)]	Зъби
Ларинкс (3 равница, 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]
	Трахея (най-малко 2 равница, включващи 1 надлъжен срез през хребетовидната структура и 1 напречен срез)
Лимфни възли (дистално от входното място на увреждането)	[Уретер]
Млечна жлеза (женска)	[Уретра]
Мускул (бедрен)	Пикочен мехур
Нософарингсни тъкани (най-малко 4 равница; 1 равнище следва да включва нософарингсния канал и назално асоциираната лимфоидна тъкан (NALT)	**Матка**
	Прицелни органи
	Всички макроскопски увреждания и разраствания на тъканна маса

▼M4

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

44. Най-малко 4 равнища на нософарингсните тъкани трябва да бъдат изследвани, едното от които следва да включва нософарингсния 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

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 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 за масова концентрация (mg/l, mg/m^3 и т.н.), а не в единици за отношение на обем (ppm, ppb и т.н.).

— Разпределение на частиците по размер, аеродинамичен диаметър при медианата на масата на частиците (MMAD) и геометрично стандартно отклонение (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 пробовземане за определяне на концентрацията и разпределението на частиците по размери в камерата.

— Подробна информация за използвания метод за анализ на химикала и за валидирането на метода (включително и ефикасността на добива на изпитвания химикал от матрицата на пробата).

— Метод на случаен подбор при разпределяне на животните в изпитвани и контролни групи.

— Подробна информация за качеството на храната и водата (включително тип на хранителния режим/източник, водоизточник).

— Обосновката за избора на концентрациите за изпитване.

Резултати

— Таблично представяне на данните за температурата, относителната влажност и въздушния поток в камерата.

— Таблично представяне на данните за номиналната и действителната концентрация в камерата.

— Таблично представяне на данните за размера на частиците, включително аналитични данни за пробовземането, за разпределението на частиците по размери, и изчисления на MMAD и 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 ОИСР за хуманен край (3).

— Трябва да бъде идентифициран прицелният орган(и).

— Трябва да бъдат определени нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект (NOAEL) и най-ниската доза, при която се наблюдава неблагоприятен ефект (LOAEL).

ПРЕПРАТКИ:

(1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline № 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 равностоен на Указание за изпитване 452 на ОИСР (ОИСР TG 452) (2009 г.). Първоначалното Указание за изпитване 452 е прието през 1981 г. Разработването на този преработен метод Б.30 беше счетено 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 ОИСР № 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 ОИСР (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 ОИСР 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 ОИСР 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 понататъшно 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 полово зрели животни от обичайно използваните за лабораторни изследвания породи. Изследването за хронична токсичност трябва да се провежда върху животни от една и съща порода и източник като тези, които са използвани при предварителното(ите) изследване(ия) за токсичност с по-малка продължителност. Женските индивиди следва да не са раждали и да не са бременни.

Условия на отглеждане и хранене

16. Животните могат да бъдат настанени в клетките индивидуално или на малки групи от един и същ пол; индивидуалното настаняване следва да бъде 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 предпочитане, преди животните да навършат 8 седмици. Опитните животни трябва да се опишат по отношение на вид, порода,

▼M4

източник за доставка, пол, телесно тегло и възраст. При започване на изследването колебанието на индивидуалните стойности на телесното тегло на използваните животни трябва да бъде минимално и да не превишава ± 20 % от средното тегло на всички животни от същия пол в рамките на изследването. Животните се разпределят на случаен принцип в контролни групи и групи за третиране. След прилагането на подбора на случаен принцип следва да няма значителни разлики между средните стойности на телесното тегло в отделните групи в рамките на съответния пол. Ако съществуват статистически значими разлики, тогава стъпката по подбор на случаен принцип трябва да се повтори, ако е възможно. За всяко животно се определя уникален идентификационен номер и му се поставя постоянна маркировка с този номер чрез поставяне на татуировка, имплантиране на микрочип или чрез друг подходящ метод.

ПРОЦЕДУРА

Брой и пол на животните

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

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

19. Проучването може да предвижда междинни умъртвявания (най-малко 10 животни от пол от група), например на 6 месеца, за предоставяне на информация за напредването на токсикологични изменения и механистична информация, ако е научно обосновано. Когато такава информация вече е достъпна от предходни изследвания на изпитвания химикал за токсичност при повтарящи се дози, възможно е междинните умъртвявания да не са научно обосновани. Могат да бъдат включени също и сателитни групи, за мониторинг на обратимостта на всякакви токсикологични промени, причинени от изпитвания химикал, който е предмет на проучването; те обичайно 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 обичайно 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 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

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 хранителния режим или питейната вода, или чрез хранене през сонда. Допълнителна информация за пътища и начини на прилагане е представена в Ръководство № 116 (6). Пътят и начинът на прилагане зависят от целта на изследването, физичните и химичните свойства на изпитвания химикал, неговата биодостъпност и преобладаващия път и начин на експозиция на хора. Следва да се представи обосновка за избрания път и начин на прилагане. С оглед на хуманното отношение към животните, храненето по орален път през сонда обичайно следва да се избере само за онези агенти, за които този път и начин на прилагане е в разумна степен представителен за потенциалната експозиция на хора (напр. фармацевтични продукти). За химикали, свързани с хранителния режим или с околната среда, включително пестициди, прилагането е обичайно чрез хранителен режим или чрез питейната вода. Въпреки това, при някои сценарии, напр. професионална експозиция, прилагане по други пътища може да бъде по-подходящо.

29. Когато е необходимо, изпитваният химикал е в разтвор или в суспензия в подходящ носител. Трябва да бъдат разгледани следните характеристики на носителя и, съответно, други добавки: ефекти върху абсорбцията, разпределението, метаболизма или задържането на изпитвания химикал; ефекти върху химичните свойства на изпитвания химикал, които могат да изменят токсикологичните му характеристики; и ефектите върху консумирането на храна или вода, или хранителния статус на животните. Препоръчва се, когато е възможно, най-напред да се прецени дали може се използва воден разтвор/суспензия, след това — разтвор/емулсия в масло (напр. царевично олио), а след това — разтваряне в други носители. Когато се използват други носители освен водата, трябва да се 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).

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 разредени, за да се избегнат силни локални ефекти. Изпитването при концентрации, за които съществува вероятност да причиняват корозивно или дразнещо действие върху стомашно-чревния тракт, следва да се избягва.

Продължителност на изпитването

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

НАБЛЮДЕНИЯ

34. Всички животни трябва да бъдат проверени за заболяемост или смъртност, обикновено в началото и в края на всеки ден, включително в съботни и неделни дни и празници. Поне един път на ден се правят общи клинични наблюдения, за предпочитане по едно и също време, като се взема предвид периодът с пикови стойности на очакваните въздействия след получаване на дозата в случаите на прилагане чрез хранене през сонда.

▼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. Отбелязваните 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 третирането изменения в очите, всички животни трябва да бъдат изследвани. Ако от структурен анализ или от друга информация се предполага токсичност за очите, тогава честотата на изследванията на очите следва да бъде увеличена.

37. За химикали, за които в предходни 28-дневни и/или 90-дневни изпитвания за токсичност с повтаряща се доза има показания за потенциал за предизвикване на невротоксични ефекти, като опция изследвания на сензорната реактивност към различни видове стимули (24) (напр. слухови, зрителни и проприоцептивни) (25) (26) (27), оценка на силата на захвата (28) и на двигателната активност (29) могат да бъдат извършени преди започването на изследването и на 3-месечни периоди след началото на изследването, включително до изтичане на 12 месеца, както и при прекратяване на изследването (ако продължителността му е над 12 месеца). Допълнителни уточнения по процедурите, които могат да бъдат следвани, са дадени в съответните препратки. Въпреки всичко могат да се използват и алтернативни процедури, различни от тези, към които се препраща.

38. За химикали, за които в предходни 28-дневни и/или 90-дневни изпитвания за токсичност с повтаряща се доза има показания за потенциал за предизвикване на имунотоксични ефекти, като опция по-нататъшни проучвания на тази крайна точка могат да бъдат извършени при прекратяването.

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

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

▼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. Трабва 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, аспартатаминотрансфераза, 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, pH, 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 (клепачна)	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 луковица]	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 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 имунотоксичност;

— телесната маса при настъпване на смъртта;

— тегло на органите (и техните съотношения, ако е приложимо);

— находки при аутопсията;

— подробно описание на всички свързани с третирането хистопатологични находки;

— данни за абсорбция, ако са налични.

▼**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

— 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) 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 (ОВ L 276, 20.10.2010 г., стр. 33).

(20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication № 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document № 60.

(25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment 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 „Неклинични насоки относно хепатотоксичността, индуцирана от лекарствени продукти“ (док. № EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**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 ОИСР 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 физикохимични 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.

Имплантация (нидация): прикрепването на бластоциста към епителния слой, покриващ маточната кухина, включително проникването на бластоциста през епителa и навлизането му в ендометриума.

Ембрион: организмът 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: организмът 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 имплантация, 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 имплантацията 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 цезарово сечение. Когато е възможно, се обхваща и предимплантационният период. Непосредствено преди извършването на цезарово 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 ºC (± 3º) за гризачите и 18 ºC (± 3º) 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 смътни 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.

▼B

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 сечиране 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 обобщят 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 Uterusder Ratte. *Naunyn.Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.

(6) Edwards, J. A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat 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 Techniquefor 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 ss 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

Б.32. ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА КАНЦЕРОГЕННОСТ

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоен 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 Б.32 беше счетено за необходимо, за да бъдат отразени последните достижения в областта на хуманното отношение към животните и нормативните изисквания (2) (3) (4) (5) (6). Актуализирането на настоящия метод за изпитване Б.32 е проведено успоредно с преразглеждането на глава Б.30 („Изследване за хронична токсичност“) и глава Б.33 от настоящото приложение („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 Б.32 е разработен за използване при изпитвания на широк кръг от химикали, включително пестициди и промишлени химикали. Следва да се отбележи обаче, че някои подробности и изисквания могат да се различават по отношение на лекарствените средства (вж. Насока S1B на Международната конференция по хармонизация (ICH) относно изпитване за канцерогенност на фармацевтични продукти).

2. По-голямата част от изследванията за канцерогенност се извършват върху различни видове гризачи и следователно настоящият метод за изпитване е предназначен да се прилага основно за изследвания, провеждани върху тези видове. Ако за такива изследвания се изисква използване на видове, различни от гризачи, следва да се прилагат, с подходящи изменения, принципите и процедурите, описани в настоящия метод за изпитване, заедно с тези, разгледани в глава Б.27 от настоящото приложение („Изследване на субхронична орална токсичност — 90-дневно изследване на токсичността при не гризачи с повтаряща се доза“) (6). Допълнителни насоки са налични в Ръководство на 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 указания на ОИСР за прилагане на изпитвани химикали по дермален (7) и инхалационен път (7) (8). Глава Б.8 от настоящото приложение (9) и глава Б.29 от настоящото приложение (10), заедно с Ръководство на 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 В.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-често появяване на тумори, по-голям пропорционален дял на злокачествените тумори, или до намаляване на времето за появяване на тумори в сравнение с паралелни контролни групи,

— идентифициране на прицелния(те) орган(и) за канцерогенността,

— идентифициране на времето за появяване на тумори,

— характеризиране 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 разгледана от лабораторията, извършваща изпитвания, преди провеждането на изследването, с цел да се съсредоточи планът на изследването върху по-ефикасно изпитване на потенциала за канцерогенност и свеждане до минимум използването на животни. Информацията за и разглеждането на начина на действие на предполагаемия канцероген (2) (7) (12) (13) (14) (15) е от особено значение, тъй като оптималният план може да се различава в зависимост от това дали изпитваният химикал е известен или предполагаем генотоксичен канцероген. Допълнителни насоки относно разглеждането на начина на действие могат да бъдат намерени в Ръководство № 116 (7).

8. Информация, която ще помогне за съставянето на план на изследването, включва идентичност, химична структура и физични и химични свойства на изпитвания химикал; резултатите от всякакви извършени *in vitro* или *in vivo* изпитвания за токсичност, включително изпитвания за генотоксичност; очаквани употреби и потенциал за експозиция на човека; налични данни за (количествена) зависимост структура-активност, мутагенност/генотоксичност, канцерогенност и други токсикологични данни за химикали със сходна структура; достъпни токсикокинетични данни (данни за кинетика на еднократна, а също и на повтаряща се доза, където са достъпни) и данни, получени от други изследвания с повтаряща се експозиция. Оценката на

▼M4

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 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 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 възможно най-ниско. Следва периодично да се генерира аналитична информация относно равнищата на хранителните вещества

▼M4

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. 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 ОИСР № 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 третирането, след това най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно. Измерването на консумацията на храна и на усвояването на храната следва да се извършва най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно. Консумацията на вода трябва да се измерва най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно, ако химикалът се прилага чрез питейната вода. Измервания на консумацията на вода също следва да бъдат предвидени при изследвания, при които питейната активност се изменя.

Хематология, клинична биохимия и други 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 счетено за целесъобразно, изследвания на кръвни проби за хематология и клинична химия и на урина могат да се провеждат като част от междинно умъртвяване (точка 20) и при прекратяване на изследване, върху минимум 10 животни от пол за група. Кръвните проби се вземат от избран обект, например чрез сърдечна пункция, или от ретроорбиталния синус, под упойка, и следва да се съхраняват при подходящи условия, ако е приложимо. Кръвни натривки може също така да се подготвят за изследване, особено ако костният мозък изглежда да е прицелният орган, въпреки че стойността на това изследване за оценка на канцерогенния/онкогенния потенциал е под съмнение (32).

ПАТОЛОГИЯ

Макроскопска аутопсия

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

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

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.

▼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 (ОВ L 276, 20.10.2010 г., стр. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication № 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(32) Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**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 равностоен на Указание за изпитване 453 на ОИСР (ОИСР TG 453) (2009 г.). Първоначалното Указание за изпитване 453 е прието през 1981 г. Разработването на този преработен метод Б.33 беше счетено 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 ОИСР № 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 ОИСР 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 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 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 обстойни клинични наблюдения, правени над животни с цел да се получи колкото е възможно повече информация.

6. Целите на изследванията за хронична токсичност/канцерогенност, обхванати от настоящия метод за изпитване, включват:

— идентифициране на канцерогенните свойства на даден изпитван химикал, водещи до по-често появяване на тумори, по-голям пропорционален дял на злокачествените тумори, или до намаляване на времето за появяване на тумори в сравнение с паралелни контролни групи,

— идентифициране на времето за появяване на тумори,

— идентифициране на хроничната токсичност на изпитвания химикал,

— идентифициране на прицелния(те) орган(и) за хроничната токсичност и канцерогенността,

— характеризиране на зависимостта доза-отговор,

— идентифициране на нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект (NOAEL) или на отправната точка за установяване на еталонна доза (BMD),

— екстраполация на канцерогенните ефекти за експозиция на човека при ниски нива на доза,

— прогнозиране на ефекти на хронична токсичност при нива на експозиция на човека,

— предоставяне на данни на изпитване на хипотези относно начина на действие (2) (7) (12) (13) (14) (15).

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

7. При оценката на потенциалната канцерогенност и хронична токсичност на даден изпитван химикал цялата достъпна информация за изпитвания химикал следва да бъде разгледана от лабораторията, извършваща изпитвания, преди провеждането на изследването, с цел да се съсредоточи планът на изследването върху по-ефикасно изпитване на неговите токсикологични свойства и да се сведе до минимум използването на животни. Информацията за и разглеждането на начина на действие на предполагаемия канцероген (2) (7) (12) (13) (14) (15) е от особено значение, тъй като оптималният план може да се различава в зависимост от това дали изпитваният химикал е известен или предполагаем генотоксичен канцероген. Допълнителни насоки относно разглеждането на начина на действие могат да бъдат намерени в Ръководство № 116 (7).

8. Информация, която ще помогне за съставянето на план на изследването, включва идентичност, химична структура и физични и химични свойства на изпитвания химикал; всякаква информация за начина на действие; резултатите от всякакви извършени *in vitro* или *in vivo* изпитвания за токсичност, включително изпитвания за генотоксичност; очаквани употреби и потенциал за експозиция на човека; налични данни за (количествена) зависимост структура-активност, мутагенност/генотоксичност, канцерогенност и други токсикологични данни за химикали със сходна структура; достъпни токсикокинетични данни (данни за кинетика на еднократна, а също и на повтаряща се доза, където са достъпни) и данни, получени от други изследвания с повтаряща се експозиция. Определянето на хроничната токсичност/канцерогенността трябва да се извършва само след получаване на

▼M4

първоначална информация относно токсичността от 28-дневно и/или 90-дневно изпитвания за токсичност при повтаряща се доза. Краткосрочни изпитвания за зараждане и размножение на ракови клетки също така биха могли да предоставят полезна информация. Поетапният подход за изпитване за канцерогенност следва да се разглежда като част от цялостната оценка на възможните неблагоприятни въздействия на даден изпитван химикал върху здравето (16) (17) (18) (19).

9. Статистическите методи, които са най-подходящи за анализ на резултатите, като се имат предвид планът на изследването и целите, следва да бъдат определени преди началото на изследването. Въпроси за разглеждане включват дали статистиката следва да включва корекция за преживяемост, анализ на кумулативни рискове от тумори, свързани с продължителността на преживяемостта, анализ на времето до образуване на тумора и анализ в случай на преждевременно прекратяване на използването на една или повече групи. Насоки относно подходящите статистически анализи и ключови препратки към международно приети статистически методи са дадени в Ръководство № 116 (7), също и в Ръководство № 35 за анализ и оценка на изследвания за хронична токсичност и канцерогенност (20).

10. При провеждане на изследването за канцерогенност ръководните принципи и съображенията, формулирани в Ръководството на 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 умъртвено по хуманен начин. Решението следва да включва съображение относно стойността на информацията, която ще бъде получена от продължаване на изследването с даденото животно във връзка с общото му състояние. Ако се вземе решение за продължаване на изпитването с животното, честотата на наблюденията трябва да се увеличи доколкото е необходимо. Би било възможно също така, без да се засяга неблагоприятно целта на изпитването, временно да бъде преустановено дозирането, ако това ще допринесе за премахване на болката или дистреса, или да бъде намалена дозата на изпитването*.“

11. Подробни насоки относно и обсъждане на принципите на избора на доза за изследванията за хронична токсичност и канцерогенност могат да бъдат намерени в Ръководство № 116 (7), както и в две публикации на Международния институт за науките за живота (22) (23). Основната стратегия за избор на доза зависи от основната цел или цели на изследването (точка 6). При избора на подходящи нива на доза следва да се постигне равновесие между скрининга за опасност, от една страна, и характеризирането на отговорите на ниски дози и тяхната уместност, от друга страна. Това е от особено значение в случая на настоящото комбинирано изследване за хронична токсичност и за канцерогенност.

12. Следва да се разгледа възможността за провеждане на настоящото комбинирано изследване за хронична токсичност и канцерогенност, вместо отделно провеждане на изследване за хронична токсичност (глава Б.30 от настоящото приложение) и на изследване за канцерогенност (глава Б.32 от настоящото приложение). Комбинираното изпитване осигурява по-голяма ефикасност по отношение на време и разходи и известно намаляване на използването на животни в сравнение с провеждането на две отделни изследвания, без да се прави компромис с качеството на данните нито във фазата на изпитване за хронична токсичност, нито във фазата за 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.

▼M4

За гризачи всяка група с определена доза (както е посочено в точка 22) и паралелна контролна група, планирани за използване във фазата за хронична токсичност от изследването, трябва да се състои от най-малко 10 животни от всеки пол. Следва да се отбележи, че този брой е по-малък от броя в изследването за хронична токсичност (глава Б.30 от настоящото приложение). Интерпретирането на данните от намаления брой животни в група във фазата за хронична токсичност на това комбинирано изследване обаче ще бъде подпомогнато с данните от по-големия брой животни във фазата за канцерогенност от изследването. При изследвания, включващи мишки, могат да бъдат необходими допълнителни животни във всяка група с определена доза във фазата за хронична токсичност, за извършване на всички изисквани хематологични 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 се до новообразувания, и механистична информация, ако е научно обосновано. Когато такава информация вече е достъпна от предходни изследвания на изпитвания химикал за токсичност при повтарящи се дози, възможно е междинните умъртвявания да не са научно обосновани. Животните, използвани във фазата за хронична токсичност от изследването, обикновено с продължителност от 12 месеца (точка 34), предоставят данни от междинно умъртвяване за фазата за канцерогенност от изследването, като по този начин се постига намаляване на броя на животните, използвани като цяло. Във фазата за хронична токсичност от изследването могат да бъдат включени също и сателитни групи, за мониторинг на обратимостта на всякакви токсикологични промени, причинени от изпитвания химикал, който е предмет на проучването. Те могат да бъдат ограничени до най-високото ниво на доза за изследването, плюс контрол. Допълнителна индикаторна група от животни (обикновено по 5 животни от всеки от двата пола) може да бъде включена, за мониторинг на здравния статус по време на изследването, ако е необходимо (30). Допълнителни насоки относно планирането на изследването за вклюване 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 преминат 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 избирано така, че да бъдат получени доказателства за токсичност, както се доказва, например, чрез подтискане наддаването на тегло (около 10 %). Въпреки това, в зависимост от целите на изследването (вж. точка 6), може да бъде избрана максимална доза, която да е по-ниска от дозата, доказваща наличието на токсичност, например, ако при дадена доза се проявява неблагоприятен ефект, който дава повод за загриженост, но който има незначително влияние върху продължителността на живота или телесното тегло.

25. Нивата на доза и интервалите между тях могат да бъдат избрани така, че да бъдат установени зависимостта доза-отговор и — в зависимост от начина на действие на изпитвания химикал — NOAEL или други очаквани резултати от изследването, например BMD (вж. точка 27). Фактори, които следва да бъдат 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. 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 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).

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 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 12 месеца (фаза за хронична токсичност) или 24 месеца (фаза за канцерогенност). Експозицията по инхалаторен път се извършва в продължение на 6 часа в денонощието, 7 дни в седмицата, но експозиция за 5 дни седмично също може да бъде прилагана, ако е обоснована. Продължителността на експозицията по принцип е 12 месеца (фаза за хронична токсичност) или 24 месеца (фаза за канцерогенност). Ако експозиция на вид гризач, различен от плъх, е само през носа, максималната продължителност на експозицията може да бъде адаптирана така, че да се минимизира специфичният за този вид дистрес. Трябва да бъде предоставена обосновка при използване на продължителност на експозицията по-малка от 6 часа дневно. Вж. също глава Б.8 от настоящото приложение (9).

33. Когато изпитваният химикал се прилага чрез сонда на животните, това следва да се извърши посредством стомашна тръбичка или подходяща канюла за интубация, по едно и също време всеки ден. Обикновено еднократната доза се прилага веднъж дневно, но когато например даден химикал е местен дразнител, може да е възможно поддържането на ежедневната доза да се извършва чрез прилагането ѝ като разделена доза (два пъти дневно). Максималният обем течност, който може да бъде въведен еднократно, зависи от телесното тегло на изпитваното животно. Обемът следва да се запазва възможно най-нисък и по принцип не следва да надхвърля 1 ml/100 g телесно тегло за гризачи (31). Варирането на обема за изпитването следва да бъде сведено до минимум чрез настройване на концентрацията така, че да се осигури постоянен обем при всички нива на доза. Потенциално корозивните или дразнещи химикали са изключение и трябва да бъдат разредени, за да се избегнат силни локални ефекти. Изпитването при концентрации, за които съществува вероятност да причиняват корозивно или дразнещо действие върху стомашно-чревния тракт, следва да се избягва.

Продължителност на изследването

34. Периодът на дозирането и продължителността на фазата за хронична токсичност при това изследване обичайно е 12 месеца, като планът на изследването допуска също така, и може да бъде прилаган или за изследвания с по-малка продължителност (напр. 6 или 9 месеца), или за такива с по-голяма (напр. 18 или 24 месеца), в зависимост от изискванията на специфичната нормативна уредба или за конкретни механистични цели. Отклоненията от продължителността на експозиция от 12 месеца трябва да бъдат обосновани, особено в случаите с по-кратка продължителност. Животните от всички групи с определена доза, разпределени към тази фаза, се умъртвяват в определеното време за оценка на хроничната токсичност и патологията, която не се отнася до новообразувания. Сателитните групи, включени за мониторинг на обратимостта на всякакви токсикологични промени, индуцирани от изпитвания химикал, предмет на проучването, следва да бъдат оставени без дозиране за период не по-кратък от 4 седмици и не по-дълъг от една трета от общата продължителност на изследването след приключването на експозицията.

35. Продължителността на фазата за канцерогенност от това изследване обичайно е 24 месеца за гризачи, представляващи по-голямата част от нормалната продължителност на живота на животните, които ще бъдат използвани. По-дълги или по-кратки продължителности на изследване могат да бъдат използвани, в зависимост от продължителността на живота на породата от изследвания животински вид, но следва да бъдат обосновани. За конкретни породи мишки, напр. AKR/J, C3H/J или C57BL/6J, продължителност от 18 месеца може да е по-подходяща. Следното също така предоставя някои насоки относно продължителността, прекратяването на изследването и преживяемостта; допълнителни насоки, включително разглеждане на приемливостта на отрицателен резултат от изпитване за канцерогенност, свързан с преживяемостта в изследването, са предоставени в Ръководство № 116 (7):

▼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 извършващите наблюденията да са сведени до минимум и да са независими от изпитваната група. Тези наблюдения следва да се правят извън клетката, която обитава животното, за предпочитане в стандартна обстановка и във всички случаи по едно и също време. Тези наблюдения следва да се описват внимателно, за предпочитане с използване на точкови системи, изрично определени от лабораторията, извършваща изпитвания. Трябва да бъде направено усилие да се осигурят минимални колебания в условията за наблюдение. Отбелязваните симптоми следва да включват, без да се ограничат само до промяна в кожата, козината, очите, лигавиците, поява на 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 третирането, след това най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно. Измерването на консумацията на храна и на усвояването на храната следва да се извършва най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно. Консумацията на вода трябва да се измерва най-малко веднъж седмично в продължение на първите 13 седмици, а след това най-малко веднъж месечно, ако химикалът се прилага чрез питейната вода. Измервания на консумацията на вода също следва да бъдат предвидени при изследвания, при които питейната активност се изменя.

Хематология и клинична биохимия

42. При изследвания, включващи гризачи, трябва да се извършват хематологични изследвания върху всички животни от изследването (10 мъжки и 10 женски животни на група) на 3, 6 и 12 месеца, както и при прекратяване на изследването (ако е по-дълго от 12 месеца). При мишките може да са необходими сателитни животни за осъществяването на всички изисквани хематологични 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 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.

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 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

▼M4

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, аспартатаминотрансфераза, глутаматдехидрогеназа, общо жлъчни киселини) (39) и най-малко две подходящи изпитвания за хепатобилиарна оценка (алкална фосфатаза, гама-глутамилтрансфераза, 5'-нуклеотидаза, общо билирубин, общо жлъчни киселини) (39). Други клинични химични параметри, като триглицериди на гладно, специфични хормони и холинестераза, могат да бъдат измервани според случая в зависимост от токсичността на изпитвания химикал. Като цяло е необходим гъвкав подход, в зависимост от наблюдаваното и/или очакваното въздействие от даден изпитван химикал.

45. Изследвания на урината следва да се извършат върху всички изследвани животни (10 мъжки и 10 женски животни от група), чрез проби, събрани през същите интервали, както за хематологичните и клиничните химични изследвания. Измервания на 3 месеца не е необходимо да се провеждат, ако в предходно 90-дневно изследване, проведено при сравними нива на доза, не е наблюдавано въздействие върху изследванията на урина. Следният списък с параметри е бил включен в експертна препоръка относно изследванията на клиничната патология (38): външен вид, обем, осмолалност или относителна плътност, pH, 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.

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 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.

49. Следните тъкани следва да бъдат консервирани в среда за фиксиране, най-подходяща както за вида тъкан, така и за очакваното последващо хистопатологично изследване (40) (тъканите в средни скоби са по избор):

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

▼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 луковица]	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 изпитвнето,

— 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 RoutineAssessment 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 (P) 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 F_1 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.

▼B

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 д а 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 F_1. Трябва да се има предвид модифициране на схемата за дозиране на базата на друга съществуваща информация за изпитваното вещество, като стимулиране на метаболизма или биоакумулиране.

Процедура за чифтосване

При изпитвания за токсичност за размножаването може да се използва чифтосване в съотношение 1:1 (едно мъжко за едно женска 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 преглеждани 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 P 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 P 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 P 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 P. 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.

▼B

Б.35. ИЗПИТВАНЕ ЗА РЕПРОДУКТИВНА ТОКСИЧНОСТ В ДВЕ ПОКОЛЕНИЯ

1. МЕТОД

Този метод е еквивалентен на метод ОИСР 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 тъканни 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 женска 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 (± 3°). 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.

▼B

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.

▼B

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 третират 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 по-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 опложданe 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 полово зрели 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 взима 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 P 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 разреди 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 труповете 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 подбрано 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 труповете им не са мацерирани, трябва да се изследват за възможни дефекти и/или причини за смъртта. Труповете 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 подбрано 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 P 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 P и F1 животни, избрани за чифтосване.

Пълно хистопатологично изследване на съхранените органи и тъкани, изброени по-горе, трябва да бъде направено за всички P 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 P 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/дози, 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/дози, 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).

▼B

1.5.8.2. *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. **ДАННИ**

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 животните 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.

▼B

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, постналалния 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 постналалното 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 Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491—505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298—303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, JJ. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, JJ. 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, JJ. (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 CD. 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 равностоен на Указание за изпитване 417 на ОИСР (ОИСР TG 417) (2010 г.). Изследванията, изучаващи токсикокинетиката (ТК) на даден изпитван химикал, се провеждат с цел да се получи подходяща информация относно неговите абсорбция, разпределение, биотрансформация (т.е. метаболизъм) и екскреция, за подпомагане свързването на концентрацията или дозата с наблюдаваната токсичност, и за подпомагане разбирането на неговия механизъм на токсичност. ТК може да допринесе за разбирането на токсикологичните изследвания, като докаже, че изпитваните животни са системно експонирани на изпитвания химикал, и като разкрие кои са частите, които са в циркулация (изходен химикал/метаболити). Основните ТК параметри, определени от тези изследвания, предоставят също така информация по отношение на потенциала за натрупване на изпитвания химикал в тъкани и/или органи и на потенциала за предизвикване на биотрансформация в резултат на експозиция на изпитвания химикал.

2. ТК данни могат да допринесат за оценката на адекватността и относимостта на данните за токсичност от животни за екстраполация за опасността и/или оценката на риска за човека. В допълнение, токсикокинетичните изследвания могат да предоставят полезна информация за определяне нивата на доза за изследванията за токсичност (линейна срещу нелинейна кинетика), ефектите от пътя на прилагане, бионаличността, както и за въпроси във връзка с плана на изследването. Някои видове ТК данни могат да се използват при разработване на физиологично характеризирани токсикокинетични (PBTK) модели.

3. Съществуват важни приложения за данните за метаболити/ТК, като предлагане на възможни видове токсичност и начини на действие и тяхната връзка с нивото на доза и пътя на експозиция. В допълнение, данните за метаболизма могат да предоставят полезна информация за оценка на токсикологичната значимост на експозициите на екзогенно генерирани метаболити на изпитвания химикал.

4. Адекватни токсикокинетични данни ще бъдат от полза да се подпомогне по-нататъшното приемане и прилагане на количествените зависимости структура-активност, подходите на съпоставяне или групиране при оценката на безопасността на химикалите. Данните от кинетиката могат също така да бъдат използвани при оценка на относимостта, в токсикологично отношение, на други изследвания (например *in vivo*/*in vitro*).

5. Освен ако е посочен друг път на експозиция (вж. по-специално точка 74—78), настоящият метод за изпитване се отнася за орален път на прилагане на изпитвания химикал.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

6. В нормативните уредби се съдържат различни изисквания и нужди по отношение на измерването на крайните точки и параметрите, свързани с токсикокинетиката за различните класове химикали (напр. пестициди, биоциди, промишлени химикали). За разлика от повечето методи за изпитване настоящият метод за изпитване описва изпитването на токсикокинетиката, което включва множество измервания и крайни точки. В бъдеще могат да бъдат разработени няколко нови методи за изпитване и/или ръководства, за отделно и по-подробно описване на всяка крайна точка. При настоящия метод за изпитване изискванията и/или нуждите на всяка конкретна нормативна уредба определят какви изпитвания или оценки ще се извършват.

▼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}), pKa, 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 ОИСР 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 ОИСР (GD 19) (2). Препоръчва се ОИСР GD 19 да бъде консултирано при всички изследвания *in vivo* и *in vitro*, описани в настоящия метод за изследване.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДИТЕ

Пилотни изследвания

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

▼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 бъди 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 ± 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 °C (± 3 °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 едократна 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 поцялостно 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

▼M4

се използва инфузионна помпа. Ако се канюлира югуларната вена (за прилагане на изпитвания химикал и/или за вземане на кръв) или ако за прилагане се използва феморалната артерия, следва да се използва анестезия. Трябва да бъде отделено необходимото внимание на типа анестезия, тъй като той може да окаже въздействие върху 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 приложения 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, издишвания 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:

$$\text{Процент абсорбция} = \frac{(\text{количество едновременно в жлъчка, урина, издишан въздух и труп без да се отчита съдържанието в стомашно} - \text{чревния тракт})}{\text{приложеноколичество}} \times 100$$

34. При някои класове от изпитвания химикал може да се получи пряко секретиране 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 количественото 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:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{ИВ}) \times (Доза_{ИВ}/Доза_{exp})$$

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. Познаването 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 течно-сцинтилационно броене на уловените остатъчни вещества. Някои техники, които понастоящем са на различни етапи на развитие, напр. количествена авторадиография на цялото тяло и микроскопска авторадиография 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 третирани животни, и жлъчка, според случая.

42. Следва да бъдат положени разумни усилия за идентифициране на всички метаболити със съдържание 5 % от приложената доза или повисоко, 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 масспектрометрия, 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/масспектрометрия (LC-MS), или течна хроматография/тандем масспектрометрия (LC-MS/MS), газова хроматография/масспектрометрия (GC-MS), и ЯМР спектрометрия.

43. Ако идентифициране на метаболитите при 5 % или повече от приложената доза не е възможно, трябва да бъде представена обосновка/обяснение в окончателния доклад. Може да е уместно да се идентифицират метоболитите, 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 издишван 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 графиците 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 издишвания 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 зависещ 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 свързването с белтъци.

Кинетика в други тъкани

53. Целта на тези изследвания е да се получи информация за изменения във времето, за да се даде отговор на въпроси, свързани с теми като начина на токсично действие, биоакумулацията 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 разгледан, 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 биоакумулацията (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. микрозоми 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 микрозомните фракции от прицелни тъкани. Изследванията с микрозоми 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 микрозомите могат да бъдат полезни, за да се идентифицират конкретните микрозомни 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. микрозоми 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 PBTK 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 микрозоми. 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 P450 изоензими (напр. CYP1A1, 2E1, 1A2 и други) и/или ензими от фаза II от изходното съединение с използване на изследвания *in vitro*. Получената информация може да е полезна за съединения със сходна структура.

Използване на токсикокинетични данни от изследвания за токсичност като допълнителна информация

62. Анализът на проби от кръв, тъкани и/или екскрети, взети по време на провеждане на всякакви други изследвания за токсичност, може да предостави данни за бионаличност, изменения във времето на концентрацията в плазмата (AUC, C_{max}), потенциал за биоакумулация, 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 разгледани 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 PBTK 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 относимите (> 10 %) пътища на екскреция, K_m и V_{max} за метаболизма]. Опитните данни, използвани за разработване на даден модел, следва да се генерират с научнообосновани методи, а резултатите от прилагането на модела следва да бъдат валидирани. Параметрите, специфични за изпитвания химикал и за животинския вид, като процента на абсорбция, разпределението в кръвта и в тъканите, и скоростните константи за метаболизма често се определят с цел улесняване разработването на некомпартментни или физиологично характеризирани модели (7).

▼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, обхванатата 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 биоакумулация, разлики между половете и т.н. Резюмето следва да бъде представено достатъчно подробно, за да позволи оценка на констатациите.

Въведение

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

Материали и методи

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

а) Изпитван химикал

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

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

б) Изпитвани животни

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

в) Методи

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

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

▼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 PBTK, 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 молекулна 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 биоакумулация и нивото на остатъчните количества изходен химикал и/или метаболит(и) в тъканите, както и евентуални зависими 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 третирания участък от кожата с мек сапун и вода. Това изследване може да допринесе и за изготвяне на масовия баланс, когато изпитваният химикал се прилага по дермален път. За това изследване на измиването на кожата следва да се приложи еднократна доза от изпитвания химикал на две животни. Изборът на нивото на доза е в съответствие с точки 23 от настоящия метод за изпитване (вж. също точки 76 за дискусия относно времето за контакт с кожата). Количествата на изпитвания химикал, възстановени при измиванията, следва да бъдат определени с цел оценка на ефективността на отстраняването на изпитвания химикал чрез процедурата по измиване.

76. Изпитваният химикал следва да се приложи и задържи върху кожата в продължение на най-малко 6 часа, освен ако това е възпрепятствано от неговата корозивност. При отстраняването на покритието третирана площ трябва да се измие чрез процедурата, изложена в изследването на измиването на кожата (вж. точки 75). Както покритието, така и течността от измиването следва да бъдат анализирани за остатъчни количества от изпитвания химикал. При прекратяване на изследванията всяко животно следва да бъде умъртвено по хуманен начин в съответствие с (2), и третираната кожа следва да бъде отстранена. Подходящ срез от третираната кожа следва да бъдат анализиран 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 избирана(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-BasedP-harmacokinetic 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: (биоакумулация): 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.

АРМЕ: 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.

Авторадиография: (авторадиография 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 авторадиография 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 авторадиография, 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 течно-сцинтилационно броене.

Жлъчна екскреция: Екскреция чрез жлъчните канали.

Биоакумулация: 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

▼M4

особено важен параметър при оценката на риска за човека (екстраполация от висока към ниска доза, екстраполация от един път на експозиция към друг) за определяне на вътрешна стойност от външните NOAEL или BMD (приложена доза). За ефекти върху черния дроб при прилагане по орален път е достатъчна оралната абсорбция. Въпреки това, за всякакви ефекти, различни от тези на портала на въвеждане, като цяло не абсорбцията, а бионаличността е по-надежден параметър за последваща употреба при оценка на риска.

Биоустойчивост: Вж. „Устойчивост“.

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

C_{max}: Или максимална (върхова) концентрация в кръвта (плазма/серум) след прилагането, или максимална (върхова) екскреция (в урина или изпражнения) след прилагането.

Скорост на клирънса: 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 клирънса и разпределението са постоянни, както и стойностите на полуживота. Достигнатите концентраци 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-общи пътища, водещи до токсичност на даден изпитван химикал.

Метаболизъм: Синоним е на „биотрансформация“.

Метаболити: Продукти на метаболизма или метаболитните процеси.

Орална абсорбция: Процентът от дозата от изпитвания химикал, абсорбиран от мястото на прилагане (т.е. стомашно-чревния тракт). Този особено важен параметър може да бъде използван, за да се разбере частта от приложения 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 авторадиография на рецептори (или микроавторадиография 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 авторадиография на цялото тяло.

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

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

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

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

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

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

▼**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.

$\mathbf{T_{max}}$: 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).

▼B

1.5.2.3. *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 еефект, 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 предпочита 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 (сродинен 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 тибиалния 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 тестуване 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 увреждането 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 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. 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 третирани 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.

▼B

1.4.2.4. *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.

▼B

1.4.3.4. *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 (сродинен надлъжен срез), продълговатия мозък, гръбначния мозък и периферни нерви. Материал от гръбначния мозък се взема на ниво горен шиен отдел, средногръден и лумбосакрален. Взема се и материал от дисталния отдел на тибиалния нерв и неговите клонове към мускулус 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. **ДАННИ**

Отрицателните резултати за крайните цели, избрани за този метод (биохимия, хистопатология и наблюдение на поведението), обикновено не изискват по-нататъшно тестуване 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 увреждането 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 ^{3}H-TdR) чрез авторадиография. 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 авторадиографни 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}H-TdR в ДНК на чернодробни клетки, които имат ниска честота на клетки в S-фазата на клетъчния цикъл. Поглъщането на ^{3}H-TdR обикновено се определя чрез авторадиография, 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 ± 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 идентифакация 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 разредят преди даване на дозата на животните. Течните вещества за теста могат да се дават директно или да се разредят 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/носителят 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.

▼B

1.4.2.2. *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 метаболична 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 изключения 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 третирания 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 2m1/100g телесно тегло. Обеми, по-високите от тези, следва да се обосноват. С изключение на дразнещи или корозивни вещества, които нормално дават изостряни 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 прикрепят 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 ^{3}H-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 студеното отстраняване може и да не е необходимо. Предметните стъкла се потопяват в авторадиографична емулсия, експонират се на тъмно (напр. държат се в хладилник от 7 до 14 дни, проявяват се, оцветяват се и експонираните 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 НСД. 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}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 тестуваното 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 графиците на третиране и вземане на проби,

— методи на измерване на токсичността,

— метод на подготовка на чренодробни клетки и култура,

— използван авторадиографичен 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 индивиудално 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.

Заключения.

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 Initital 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 тъканни увреждания на кожата вследствие на прилагането на материал на изпитване (както е дефинирано от Глобалната хармонизирана система за класификация и етикетиране 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 pH, 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 раздразнение 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 алопеция 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 функцията 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)-бензалдехид	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 kΩ, 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 kΩ), или доста под (често < 3 kΩ) 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 kΩ. Етапът с фиксиране на оцветител определя дали увеличаването на йонната проницаемост 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 захванатата 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 щипка 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 KΩ, за да могат останалите дискове да се използват за изпитването. Ако стойността на съпротивлението е по-ниска от 10 KΩ, 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 μL) 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 пялата повърхност на епидермиса. Добавя се дейонизирана вода (150 μL) 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 KΩ. Измервателният мост се използва за валидиране на измерени индуктивност, капацитет, съпротивление до стойности от 2 000 H, 2 000 μF, и 2 MΩ, 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 хидратира чрез добавяне на 3 ml разтвор на $MgSO_4$ (154 mM). Електродите на измервателния мост се поставят от двете страни на кожните дискове, за да може да се измери съпротивлението в kΩ/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 $MgSO_4$. 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 kΩ, 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 $MgSO_4$ 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 kΩ 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 праговите 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 kΩ, 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 kΩ 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 B (sulforhodamine B) 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 B (sulforhodamine B)*

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 B (Кисело червено 52; C.I. 45100; EINECS номер 222-529-8; CAS номер 3520-42-1), 150 µL 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 дейонизирана 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 веки 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 B се изчислява от стойностите OD (5) (моларен коефициент на поглъщане на оцветителя сулфорходамин B при 565 nm = 8,7 x 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 (kΩ) и средните стойности на съдържанието на оцветител (µg/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 ± 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	10M 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	10M 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 10M 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 10M 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 препарата (в процент от теглото) и физична природа;

— физико-химични свойства като физично състояние, pH, 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 случая 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.

▼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 EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/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 -modificationsand validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 507—512.

▼B

13. Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro:* results of an interlaboratory trial. Toxic. *in vitro* 6, 191—194.

14. Worth 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.

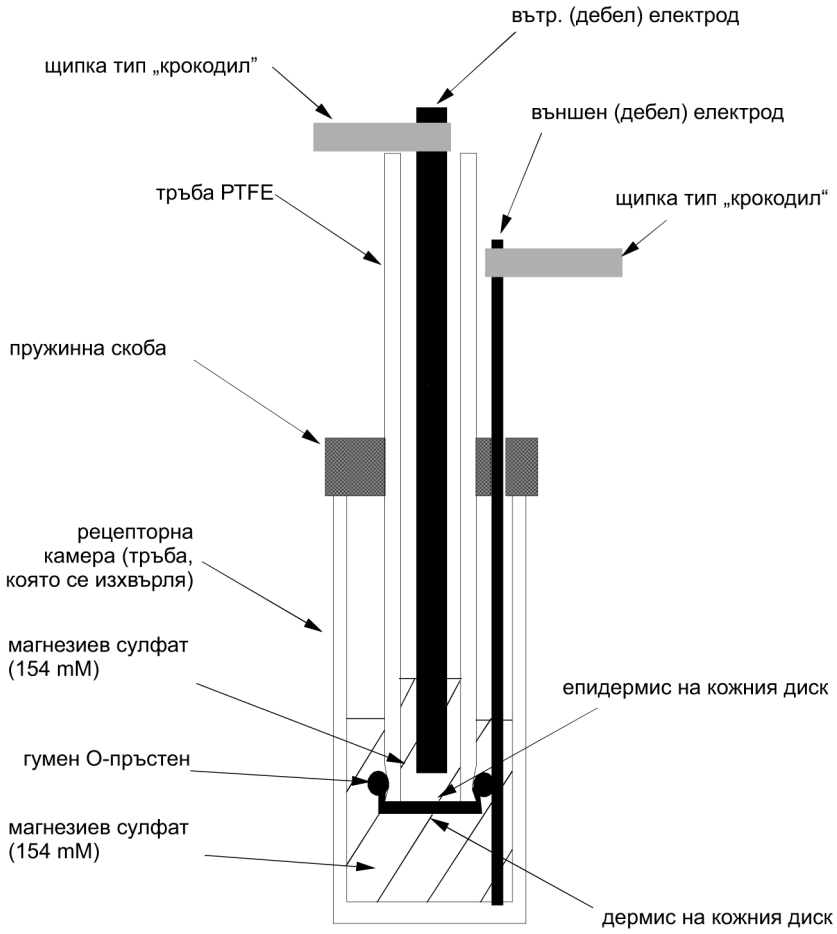
15. Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, 845—852.

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

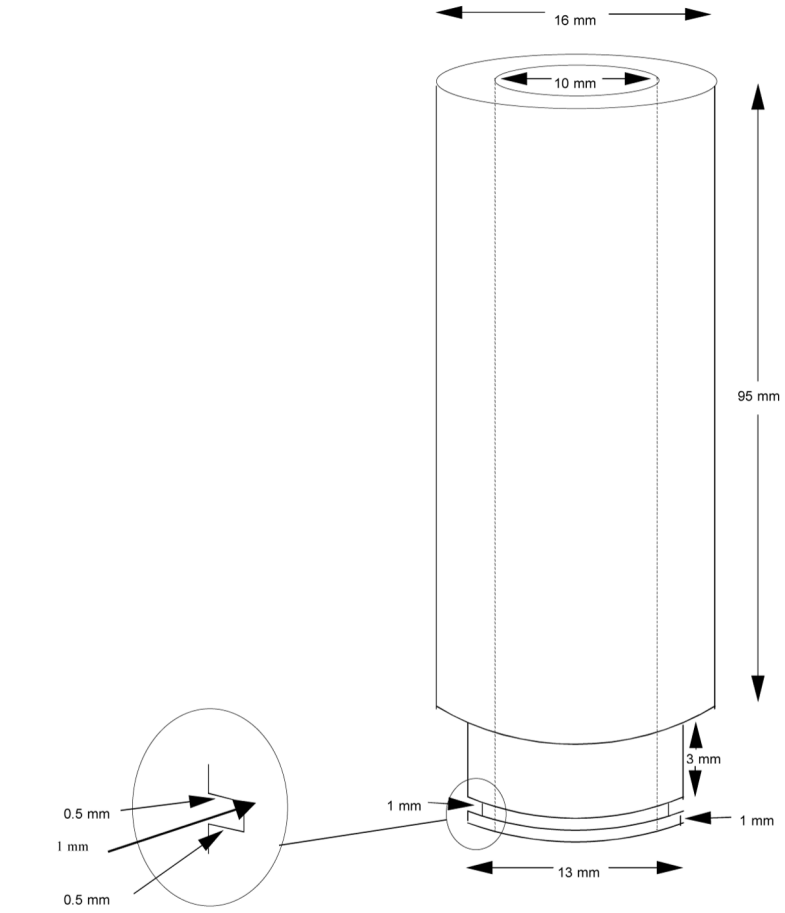
Опитна постановка за изпитване на TER върху кожа от плъхове

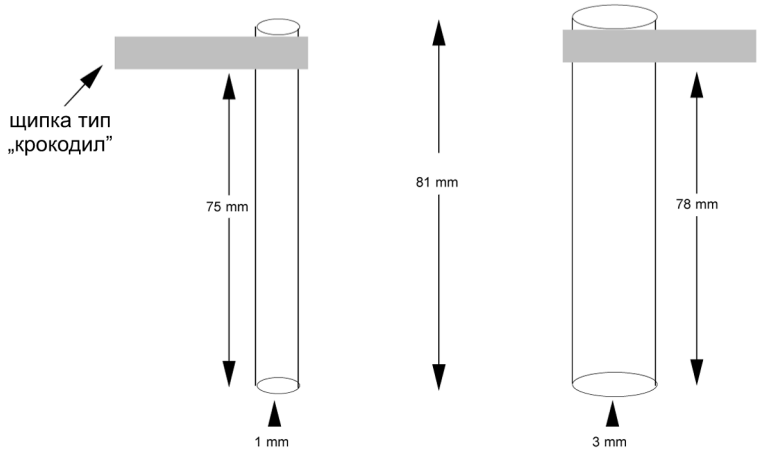


▼B

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 етикетиране 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 ревизирания 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 pH, 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 етикетиране 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 MTT), 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
Тетрахлороетилен	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 MTT (15) под определени прагови нива на определени периоди от време на въздействие. Принципът на изпитанието на модела на човешка кожа се основава върху хипотезата, че корозивните химикали могат да проникват *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 степента, 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 s*tratum corneum* към жизнената тъкан. Преминаването на изпитваните химични вещества около s*tratum 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 MTT 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. S*tratum 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 % (ET_{50}) (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 μL/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 MTT [3-(4,5-диметилтиазол-2y1)-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 MTT 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 определели 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, свързвана 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 препарата (в проценти от теглото);

— физико-химични свойства като физично състояние, pH, 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.

Заключение.

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.

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 EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. httpV/iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/episjDrd.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 asssays. 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* 3T3 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* 3T3 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 Grotthaus-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 литра $\times$ mol^{-1} $\times$ cm^{-1}, не е вероятно химичното вещество да е фотореактивно. Такова вещество не е необходимо да се изпитва с *in vitro* 3T3 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* 3T3 NRU за фототоксичност бяха наскоро оценени (6)(7)(8) (9). Изпитването *in vitro* 3T3 NRU за фототоксичност показа, 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 × s) на повърхностна площ, напр. J/m^2 или J/cm^2.

Диапазони на UV светлината: препоръчваните 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 пялата 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 монослоеве. 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 преминаването 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 % CO_2 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 пялата 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 балансирани буферни разтвори, които да са свободни от протеинови компоненти, светлинно поглъщащи компоненти (като например цветни pH-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 CO_2 инкубатора, следва да се вземат мерки да се избегне алкализирането. Ако се използват слаби буфери като EBSS, това може да се постигне чрез инкубиране на клетките при 7,5 % CO_2. Ако клетките се инкубират при 5 % CO_2, 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 (ETOH). 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 (спектър 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 широколентов 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 широколентовия UV-метър.

Дозата от 5 J/cm^2 (както е измерена в UVA диапазона) е определена за нетоксична за Balb/c 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 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:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{доза на облъчване } (J \,/\, cm^2) \times 1000}{\text{облъчване } (mW \,/\, cm^2) \times 60} \qquad (1\ \text{J} = 1\ \text{Wsec})$$

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, pH 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 pH 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 mmolar. 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 жизненост, като се използва поглъщането на неутрално червено. Следва да се покаже, че получената най-висока нетоксична доза (напр. при валидиращото изследване: 5 J/cm^2 [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 ($OD_{540\ NRU}$) 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 $OD_{540\ NRU}$ 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): $1C_{50}$ = 0,1 до 2,0 μg/ml, CPZ необлъчен (-Irr): IC_{50}= 7,0 до 90,0 μg/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 μl· хранителна среда в периферните гнезда на 96-гнездната микротитърна плочка за тъканни култури (= празни). В останалите гнезда отмерете по 100 μl·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 полуслят 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 μl·от буферния разтвор, използван за инкубацията. Добавете 100 μl·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 +Irr 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-диметил-амино-2-метилфеназин хидрохлорид, номер EINECS 209-035-8; CAS номер 553-24-2; C.I. 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 (прясно 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 % (IC_{50}). 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:

$$\mathrm{PIF} = \frac{\mathrm{IC}_{50}(-\mathrm{Irr})}{\mathrm{IC}_{50}(+\mathrm{Irr})}$$

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

$$\mathrm{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i \mathrm{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

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:

$$\mathrm{DE}_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

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 Rc(-Irr), ефектът на дозата се взима 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 взима 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 Връх	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
Прот-опорфирин 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 ДАННИТЕ

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 (+Irr и -Irr) 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 NRUза фототоксичност.

Условия на изпитване (1); *инкубиране преди и след третиране:*

— тип и състав на хранителната среда;

— инкубационни условия (концентрация на CO_2; температура; влажност);

— продължителност на нкубацията (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 × 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 червена;

— 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 +Irr и -Irr експерименти;

— анализ на кривите на реакция на концентрация: ако е възможно, изчисляване/пресмятане на IC_{50} (+Irr) и IC_{50} (-Irr);

— 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

— IC_{50}(+Irr) и IC_{50}(-Irr) и PIFMPE на веществото положителна контрола;

— исторически данни за веществото положителна контрола: IC_{50}(+Irr) и IC_{50}(-Irr) и PIFMPE; средни и стандартни отклонения.

Обсъждане на резултатите на резултатите.

Заключения.

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 Illumnation, 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.

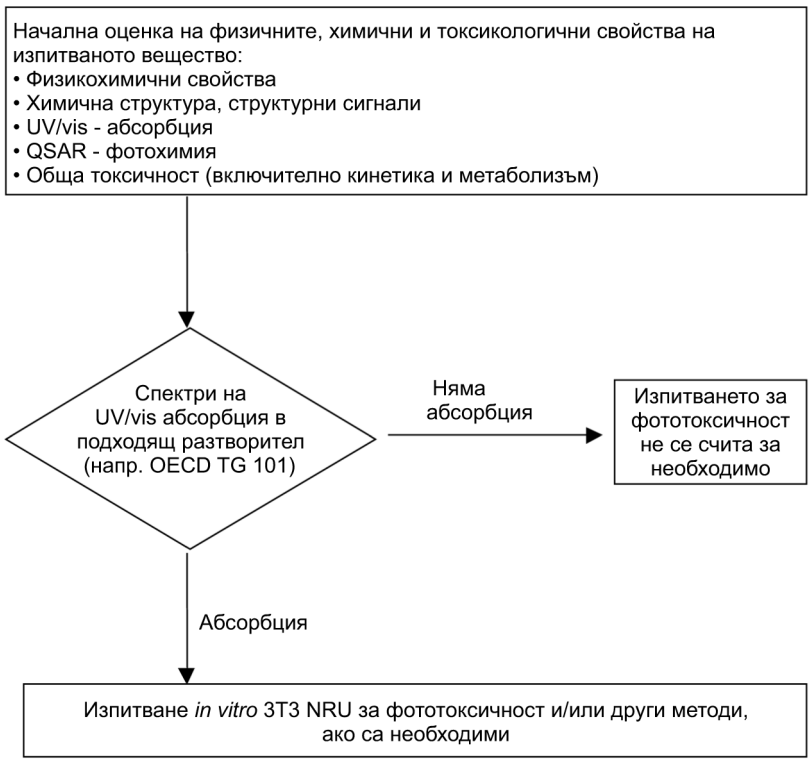
19. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445—462.

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 3T3 NRU за фототоксичност в последователния подход към изпитването за фототоксичност на веществата

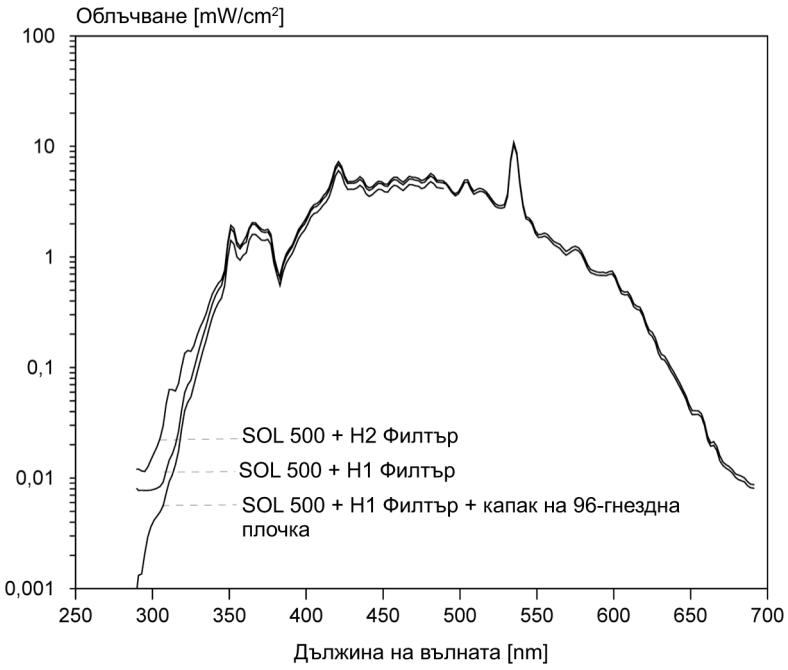


▼B

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Фигура 1

Спектрално разпределение на мощността на филтриран слънчев симулатор



(виж секция 1.4.1.5, втори параграф)

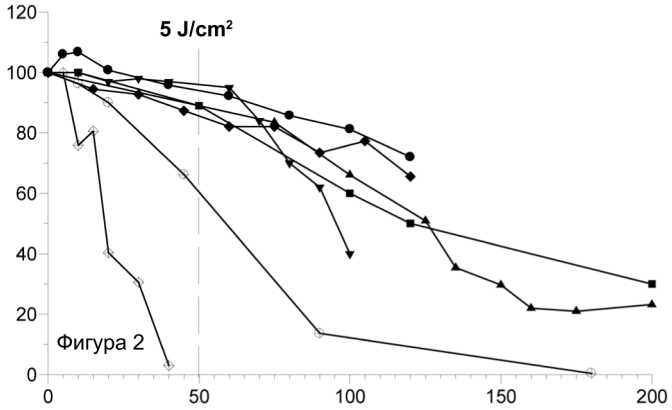
Фигура 1 дава пример за приемливо спектрално разпределение на облъчването от слънчев симулатор с филтър. Той е от подобрен метал халогенен източник, използван за валидиращото изпитване на изпитването 3T3 NRU за фототоксичност (6)(8)(17). Показани са ефектът от двата различни филтъра и допълнителният 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 3T3 NRU за фототоксичност е използван филтърът HI. 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).

▼B

Фигура 2

Чувствителност на облъчване на клетките Balb/c 3T3 (както е измерена в UVA обхвата)

Клетъчна жизнеспособност (% поглъщане на Неутрално червено от контроли на тъмно)



време на облъчване (минути)

(10 min = 1 J UVA/cm²)

(вижте секция 1.4.1.5.2, втори параграф; 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Чувствителността на клетките Balb/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 плътни символи показват клетки с приемлив толеранс на облъчване.

От тези данни беше получена най-високата нецитотоксична доза на облъчване 5 J/cm^2 (вертикалната пунктирана линия). Хоризонталната пунктирана 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 сенсибилизация 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 сенсибилизация 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 сенсибилизация и се получават количествени данни, подходящи за оценяване на зависимостта доза—отговор. Следва да се отбележи, че слабите — умерени сенсибилизатори, 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-сенсибилизиращ 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 сенсибилизация, 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 етикетиране 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 сенсибилизатори. 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 отрицателните резултати не се нуждаят от допълнително

▼M3

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 физикохимични 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 сенсибилизираща активност. При все това този метод дава възможност да се намали броят на животните, изисквани за тази цел. Освен това LLNA предлага съществено подобрение (изразяващо се в намаление на болката и страданието) на начина, по който животните се използват за изпитване на алергичната контактна сенсибилизация. LLNA се основава на отчитането на имунологичните ефекти, стимулирани от химикалите по време на индукционната фаза на сенсибилизирането. За разлика от изследванията върху морски свинчета (т.е. глава Б.6, Указание за изпитване 406 на ОИСР) (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 ОИСР, 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 ОИСР (13) (напр. фалшиво отрицателни резултати при LLNA по отношение на някои метали, фалшиво положителни резултати при определени кожни дразнители) [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 обърквane (21), могат да породят необходимост от използване на изследванията върху морски свинчета (т.е. Б.6; Указание за изпитване 406 на ОИСР) (13). Също така, въз основа на ограничената валидационна база данни, която се състои предимно от пестицидни препарати, LLNA е 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 сенсибилизаторите предизвикват пролиферация на лимфоцитите в лимфните възли, дрениращи мястото на прилагане на изпитваното вещество. Тази пролиферация е пропорционална на дозата и на потенциала на приложения алерген и осигурява лесен начин за получаване на количествено измерване на сенсибилизацията. 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 сенсибилизатор. Описаните тук процедури се основават на използването на радиоактивно маркиране *in vivo* за измерване на увеличения 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 CBA/Ca или CBA/J, 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 разредят 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 сенсибилизиращо 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

▼M3

положителни контроли са 25 % хексилканелен алдехид (№ 101-86-0 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 документиране 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 сенсибилизация 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 представляващото 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 вариабилността 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 счетени 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 ≥ 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 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) (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 (^{3}H)-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-йододеоксиуридин и 10^{-5}M флуородеоксиуридин на всички мишки през опашната вена. Пет часа (5 h) по-късно животните се умъртвяват по хуманен начин. Дренiращите 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-микронови 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 ^{3}H-преброяване, или се прехвърлят директно в гама броителни епруветки за ^{125}I-преброяване.

Определяне на клетъчната пролиферация (инкорпорирана радиоактивност)

27. Инкорпорирането на ^{3}H-метил тимидин се измерва чрез β-сцинтилационен брояч като разпадане (дезинтегриране) за минута (DPM). Инкорпорирането на ^{125}I-йододеоксиуридин 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 сенсибилизатор, 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 rLLNA и поради тази причина rLLNA не предоставя информация за зависимостта доза—реакция. Следователно rLLNA не трябва да се използва, когато е необходима информация за зависимостта доза—реакция. Както при използващото множество дози LLNA, концентрацията на изпитваното вещество, оценявана при rLLNA, 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 стимулационния 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 сенсибилизатори, 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 третираните 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 ЕС 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 графиците 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 вариабилността, при която се отчита вариабилността 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 сенсибилизатор.

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., Dreessen, 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_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 сенсибилизация

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 прогнозират 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 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) 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.

I. **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 сенсибилизация;

▼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 EC3 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 ОИСР) (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 сенсибилизация, 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 ОИСР) (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.

▼M3

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	AOO	0,049	15	0,025—0,099	0,02—0,094	+/+	+/+
3	4-фенилендиамин	106-50-3	Твърда	AOO	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	AOO	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	AOO	9,2	6	4,6—18,3	5,1—13	+/+	+/+
8	Хидроксилимонена киселина (HCA)	101-86-0	Течна	AOO	9,7	21	4,8—19,5	4,4—14,7	+/+	+/+
9	Евгенол	97-53-0	Течна	AOO	10,1	11	5,05—20,2	4,9—15	+/+	+/+
10	Фенил бензоат	93-99-2	Твърда	AOO	13,6	3	6,8—27,2	1,2—20	+/+	+/+
11	Канелен алкохол	104-54-1	Твърда	AOO	21	1	10,5—42	НИ	+/+	+/+
12	Имидазолидинил уреа	39236-46-9	Твърда	DMF	24	1	12—48	НИ	+/+	+/+
13	Метилметакрилат	80-62-6	Течна	AOO	90	1	45— 100	НИ	+/+	+/+
14	Хлорбензен	108-90-7	Течна	AOO	25	1	Не е приложимо	Не е приложимо	–/–	–/ (*)
15	Изопропанол	67-63-0	Течна	AOO	50	1	Не е приложимо	Не е приложимо	–/–	–/+

▼M3

Номер	Химикали ([1])	CAS №	Форма	Носител ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Действ-ителен обхват на EC3	LLNA спрямо MC	LLNA спрямо рез. при хора
16	Млечна киселина	50-21-5	Течна	DMSO	25	1	Не е приложимо	Не е приложи-мо	–/–	–/ (*)
17	Метил салицилат	119-36-8	Течна	AOO	20	9	Не е приложимо	Не е приложи-мо	–/–	–/–
18	Салицилова киселина	69-72-7	Твърда	AOO	25	1	Не е приложимо	Не е приложи-мо	–/–	–/–
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	MEK	28	1	14—56	НИ	+/–	+/+
21	Ксилол	1330-20-7	Течна	AOO	95,8	1	47,9—100	НИ	+/ (**)	+/–
22	Никелов хлорид	7718-54-9	Твърда	DMSO	5	2	Не е приложимо	Не е приложи-мо	–/+	–/+

Съкращения: AOO = 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; EC3 = оценена концентрация, необходима за постигането на стимулационен индекс със стойност 3; MC = резултат от изследването върху морски свинчета (т.е. глава Б.6 или Указание за изпитване 406 на ОИСР) (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 ОИСР) (1); MEK = метилетилкетон; NA = не е приложимо, тъй като стимулационният 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 сенсибилизация 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 сенсибилизация 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 EC3. За веществата даващи отрицателен резултат (т.е. със стимулационен 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 сенсибилизатори 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 сенсибилизиращи свойства, подобни на свойствата на неправилно класифицирания референтен материал) могат да бъдат счетени 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 сенсибилизиращо вещество, което е добре характеризирано в LLNA. Поради това CE за LLNA се основават на вариабилността на резултатите от повторни изпитвания на хексилканелен алдехид (HCA). С цел оценяване на вътрешнолабораторната надеждност, стойностите на оценената прагова концентрация (ECt) 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 ECt 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 сенсибилизиращи вещества, които са добре характеризирани в LLNA. CE за LLNA се основават на вариабилността на резултатите от изпитвания на хидроксилимонена киселина (HCA) и 2,4-динитрохлоробензен (DNCB) в различни лаборатории. Стойностите на ECt 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 ECt 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 сенсибилизация, 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 (ECt): 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 междулабораторната възпроизводимост (14).

Кожна сенсибилизация: 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 сенсибилизация.

Стимулационен индекс (SI): стойност, изчислявана с цел оценка на потенциала на дадено изпитвано вещество да предизвиква кожна сенсибилизация, 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 ОИСР 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 ОИСР 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 хистопатологичнии 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 се 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 препоръчваните 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).

Дозиране: 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 абревиатурата 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 ± 20 % от средното тегло за всеки пол. Когато се провежда, за кратък период от време, изследване с повтаряща се доза като предшестващо 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 (± 3 °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—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 препоръчваните 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. **Третирани 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 избирана 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 предшестващо (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 бъда 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 увеличи в максимална степен вероятността за откриване на някакви 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 бъда 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 секреция и екскреция и автономна дейност (напр. лакримация, пилоерекция, размер на зениците, необичайни респираторни модели и/или дишане през устата, някакви 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. прекомерено чесане, необичайни движения на главата, серийни (стандартни) цикли) или странно поведение (напр. хапане или прекомерено облизване, самоосакатяване, вървеж в обратна посока (на заден ход), издаване на двуци) 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 понижения, 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 бъда 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 бъда 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 индикират за специфичен вид или група невротоксичност (2)(3). Алтернативно, останалите части от животните могат също да бъде 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 тъканни 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 (под-утина), гръбначните коренови ганглии, гръбначните и коремните коренови влакна (нишки), разположения близо до средата на тялото седалищен нерв, разположения близо до средата на тялото тибиален нерв (при коляното) и мускулните разклонения при тибиалния 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 бъда 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 Giudance 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 Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

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 *in situ* 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 *ръководства*		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.

▼B

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 оценяваното 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 оценяваното 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

▼B

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. Слоят, 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 издишаният 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 ± 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 по-чувствителният 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 ºC (± 3 ºC). 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 cm^2. 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 препарата 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/cm^2 за твърди вещества или до 10 $\mu l/cm^2$ 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 полулетливи изпитвани вещества намалява степента 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 увреждa 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 ^{14}C-въглероден двуокис и летливите ^{14}C-въглеродни съединения, които следва да се анализират, ако се произвеждат в големи количества (> 5 %). Урината, изпражненията и уловените флуиди (като ^{14}C-въглероден двуокис и ^{14}C-въглеродни съединения) трябва да бъдат събирани индивидуално от всяка група във времето за взимане 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 предвижданото 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.

▼B

1.4.9. **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 нетретирана 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 забожда 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 ± 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 pH, 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) ОИСР, 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, Pedsticides and Toxic Substances.

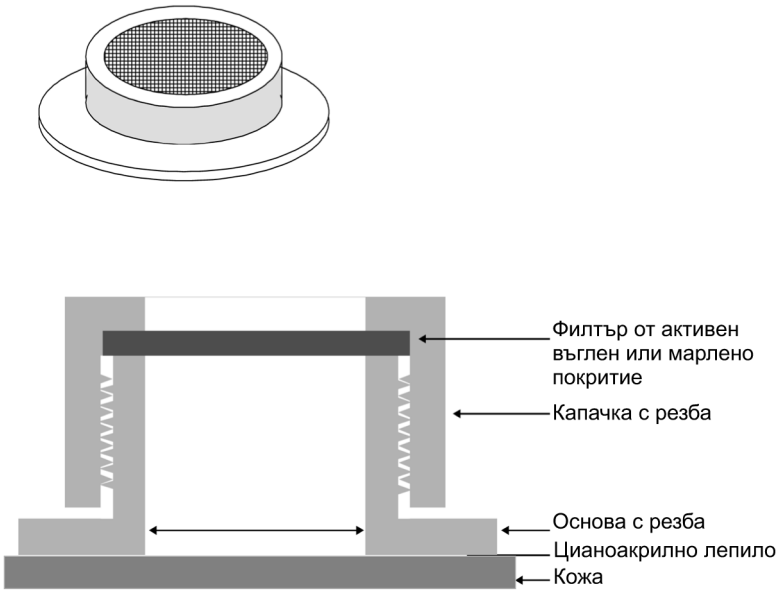
(8) Bronaugh R. L., Wester R. C., Bucks D., Maibach H. I. and Sarason R. (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369—373.

(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



▼B

Б.45. **КОЖНА АБСОРБЦИЯ: *IN VITRO* МЕТОД**

1. **МЕТОД**

Този метод на изпитване е еквивалентен на ОИСР 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 ОИСР (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 ОИСР 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 проницаемост 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 кафеин, 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 прилагания 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 препятства 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 (ca. > 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 репликата 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—5 mg/cm^2 от кожата за твърдите вещества и до 10 $\mu l/cm^2$ 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 ± 1 °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 ± 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.

▼B

2. **ДАННИ**

Трябва да бъде направи 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 66 в препратка 3). Когато се използват условия с безкрайна доза на излагане, данните могат да позволят да се изчисли константата на проницаемост (Kp). 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 Pow), 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 HI 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

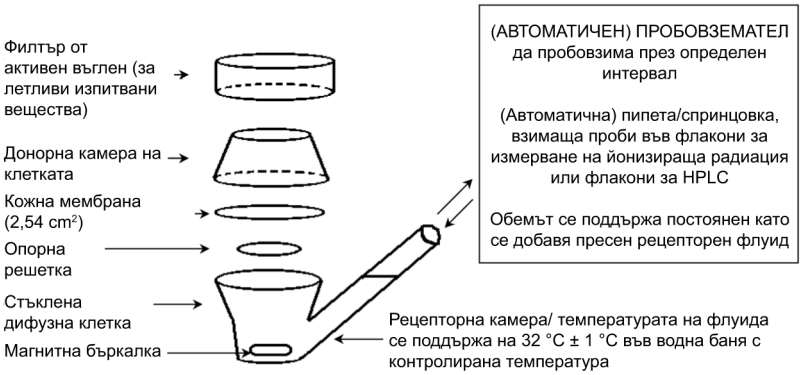
(11) Schaefer H. and Redelmeier T. E. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

(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 дразнители), настоящият МИ може също така да се използва за определяне на некласифицирани 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 ОИСР; 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 ОИСР (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 ОИСР (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 ОИСР (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 ВРМ 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 ВРМ, 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 ОИСР 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 дразнители) (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 ОИСР) 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 ОИСР) 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 ± 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). Основаните 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 MTT [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид, тиазолил синьо; CAS номер 298-93-1] в синя формазанова 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. ≤ 50 % за дразнители 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 дразнители (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 *in vivo* ([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 *in vivo* ([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 ОИСР (4).
([3]) Съгласно настоящия метод за изпитване, незадължителната категория 3 по GHS на ООН (слаби дразнители) 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 EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) и SkinEthic™ 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. Бариерната 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 % (IC_{50}) след определено време на експозиция, или чрез определяне на времето на експозиция, необходимо за намаляване на жизнеспособността с 50 % (ET_{50}) 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 MTT (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)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Бариерна 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), *бариерната 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 изпитваните 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/cm^2 или 25 mg/cm^2. 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 (СРП) 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 МТТ 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 МТТ (редуктор на МТТ), 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 МТТ и въздействията на оцветителите е налично в СРП за трите валидирани метода (26) (27) (28).

Критерии за приемливост

27. За всеки модел, използващ валидни партиди 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 вариабилността между тъканните репликати (например ако се използват стандартните отклонения (СО), те следва да бъдат в рамките на 1-странен интервал на толерантност от 95 %, изчислен на базата на данни от предишни изследвания; за СО 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 некласифицираните 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 (≤) 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 ± стандартното отклонение за всяко изпитване. Наблюдаваните взаимодействия с реагента МТТ 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 ЕС 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 критериите 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 MTT и/или оцветяващите изпитвани химикали;

— описание на други наблюдавани ефекти.

Обсъждане на резултатите

Заключение

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 Rubinsteen, 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-Tessonneaud, 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 етикетирането 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) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, Contact Dermatitis, 62, 109-116.

▼M3

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 MTT (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид, тиазолил 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).

ET_{50}: може да се оцени чрез определяне на времето на експозиция, необходимо за намаляване на клетъчната жизнеспособността с 50 % при прилагане на химичния маркер с определена фиксирана концентрация, вж. също IC_{50}.

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 етикетиране 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 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).

IC_{50}: може да се оцени чрез определяне на концентрацията на химичния маркер, при която жизнеспособността на тъканите се намалява с 50 % (IC_{50}) след фиксирано време на експозиция, вж. също ET_{50}.

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 (СЕ): 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 междулабораторната 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 тестовете), които се основават на сходни научни принципи и които измерват или прогнозират 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^{TM} (валидирания референтен метод — ВРМ), EpiDerm^{TM} SIT (EPI-200) и SkinEthic^{TM} 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 некласифицирани (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 етикетиране 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 законовите, подзаконовите и административните разпоредби относно класификацията, опаковането и етикетирането на опасни вещества ([1]). СЕ бяха актуализирани

([1]) ОВ L 225, 21.8.2001 г., стр. 1.

▼M3

поради приемането на системата за класифициране и етикетиране GHS на ООН в законодателството на ЕС (Регламент CLP на ЕС) (3), което 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 валидирания 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

▼**M3**

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 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 *in vivo*	ВРМ *in vitro* категория	*In vivo* категория по GHS на ООН/ Регламент CLP на ЕС
1-бромо-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-метоксипиридин 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
Бензенетиол, 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 *in vivo*	BPM *in vitro* категория	*In vivo* 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 дразнители 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 трансфериране 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 партиди 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 вариабилност 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 вариабилност 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 (≥) 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 трансфериране 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 (≥) от 80 %.

Прогнозен капацитет (точност)

12. Точността (чувствителността, специфичността и цялостната точност) на предложения сходен или модифициран метод следва да бъде сравнима с или по-добра от тази на ВРМ, като се взима предвид допълнителната информация, свързана с приложимостта при видовете, представляващи интерес (таблица 2). Чувствителността следва да бъде равна на или по-голяма (≥) от 80 % (2) (8) (23). При все това по отношение на чувствителността на предложения 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 (≥) от 70 % (2) (8) (23). Не е налице последващо ограничение по отношение на специфичността на предложения 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 (≥) 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 дразнители 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
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 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).

▼M2

Б. 47 **МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ НА НЕПРОЗРАЧНОСТ И ПРОПУСКЛИВОСТ НА ГОВЕЖДАТА РОГОВИЦА ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА ВЕЩЕСТВА С КОРОЗИВНО И ДРАЗНЕЩО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ ОЧИТЕ**

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Методът за изпитване на непрозрачност и пропускливост на говеждата роговица (НПГР) е метод *in vitro*, който може да се използва при определени обстоятелства и със специфични ограничения за класифициране на „вещества и смеси с корозивно или дразнещо действие върху очите“ (1) (2) (3). За целите на настоящия метод за изпитване като вещества с дразнещо действие се дефинират такива, които предизвикват лезии върху очите на заек и траят най-малко 21 дни след прилагането. Въпреки че не се смята за валиден като пълен заместител на *in vivo* теста върху заешки очи, методът НПГР се препоръчва да се използва като част от една поетапна стратегия за регулаторно класифициране и етикетиране в обхвата на конкретна област на приложимост (4) (5). Изпитваните вещества и смеси (6) могат да се класифицират като корозивни или дразнещи за очите без по-нататъшно изпитване върху зайци. Вещества, които показват отрицателен резултат, е необходимо да се изпитват върху зайци, като се прилага стратегия за последователно изпитване както това е разгледано в Ръководството за изпитания на ОИСР 405 (7) (глава Б.5 в настоящото приложение).

2. Целта на този метод за изпитване е да се опишат процедурите, използвани за оценка на потенциалното корозивно или дразнещо действие върху очите на изпитваното вещество, измерени чрез способността му да индуцира непрозрачност и повишена пропускливост върху изолирана говежда роговица. Токсичният ефект върху роговицата се измерва чрез: (i) намаленото преминаване на светлина (непрозрачност), и (ii) повишено пропускане на натриев флуоресцентен оцветител (пропускливост). Оценките за непрозрачността и пропускливостта на роговицата след прилагане на изпитваното вещество се комбинират, за да се получи *In Vitro* балова оценка за дразнещото действие (ИВБОДД), която се използва за класифициране според степента на дразнещо действие на изпитваното вещество.

3. С метода на изпитване НПГР са извършвани тестове на вещества с дразнещо действие върху очите, предизвикващи лезии, които преминават за по-малко от 21 дни и на вещества без дразнещо действие. Въпреки това не е направена официална оценка за точността и надеждността на метода за изпитване НПГР за тези категории вещества.

4. Определенията са дадени в Допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

5. Този метод за изпитване се базира на протокола за метода за изпитване НПГР (8) на Междуведомствения координационен комитет за валидиране на алтернативни методи (ICCVAM), който бе изготвен след едно международно изследване за валидиране (4)(5)(9), за което принос имаха Европейският център за валидиране на алтернативни методи (ECVAM) и Японският център за валидиране на алтернативни методи (JaCVAM). Протоколът се базира на информация, получена от Института за *in vitro* науки (IIVS) и протокол 124 на INVITTOX (10), който е протоколът, използван за изследване за предварително валидиране на анализи с НПГР, проведено в периода 1997-1998 г. и спонсорирано от Европейската общност. Тези два протокола се базират на методиката за анализ на НПГР, която за първи път се споменава от Gautheron *et al.* (11).

▼M2

6. Установените ограничения на този метод за изпитване се базират на високите равнища на неверните положителни резултати за алкохоли и кетони и високите равнища на неверните отрицателни резултати за твърди вещества, отчетени в базата данни за валидиране (вж. точка 44) (5). Когато веществата от тези химични и физични класове бъдат изключени от базата данни, точността на НПГР навсякъде в системите за класификация на ЕС, EPA и Глобалната система за хармонизиране на класификацията на химични вещества и смеси GHS значително се подобрява (5). Според целта на този анализ (т.е. да се определят само веществата с корозивно/дразнещо действие върху очите) неверните отрицателни резултати не са от критично значение, тъй като такива вещества се тестват впоследствие при зайци или чрез други съответно валидирани *in vitro* изпитания в зависимост от регулаторните изисквания, като се прилага стратегия за последователно изпитване с подход, отчитащ значимостта на различните видове данни. Освен това текущата база данни за валидирането не позволяваше да бъде направена адекватна оценка на някои класове химикали или продукти (напр. смеси). Въпреки това изследователите биха могли да използват този метод за всякакви видове изследван материал (включително за смеси), като положителният резултат може да се приеме за показател за корозивно или дразнещо действие върху очите. Все пак положителни резултати, получени от алкохоли или кетони следва да се тълкуват предпазливо, поради опасността от свръхпрогнозиране на опасност.

7. Всички процедури с говежди очи и говежда роговица следва да съответстват на приложимите за изпитателната лаборатория разпоредби и процедури за работа с материали с животински произход, които включват, но не се ограничават само с тъкани и тъканна течност. Препоръчва се спазването на универсалните лабораторни предпазни мерки (12).

8. Едно ограничение на метода за изпитване е фактът, че въпреки че той отчита някои от действията върху очите, изследвани с метода за изследване на дразнещо действие върху заешки очи, и до известна степен отчита и силата на това действие, той не взема под внимание увреждания на конюнктивата и ириса. Също така, въпреки че с анализа на НПГР не може да се направи оценка *per se* на обратимостта на лезиите върху роговицата, бе предложено въз основа на изследванията върху заешки очи оценката за първоначалната дълбочина на увреждането на роговицата да се използва за разграничаването на необратимото от обратимото действие (13). В заключение, НПГР не позволява да се направи оценка на потенциала за системно токсично действие, свързано с експонирането на очите.

9. Продължават усилията да се охарактеризират допълнително ползата и ограниченията на анализа за НПГР за определянето на вещества със слабо или без дразнещо действие (вж. също точка 45). Приканват се потребителите да предоставят на валидиращите организации проби и/или данни за официално оценяване на възможните бъдещи приложения на метода за изпитване НПГР, включително и за определяне на вещества със слабо или без дразнещо действие.

10. Всяка лаборатория, която за първи път започва да извършва такива анализи, следва да използва опитните химикали, посочени в Допълнение 2. Лабораториите могат да използват тези химикали за доказване на своята техническа компетентност за прилагане на метода за изпитване НПГР преди предаване на данните от анализа за НПГР за целите на регулаторното класифициране според степента на опасност.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

11. Методът за изпитване НПГР 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 изпитваното вещество, се оценява посредством количествени измервания на измененията в непрозрачността и пропускливостта на роговицата, извършвани съответно с уред за измерване на непрозрачността и спектрофотометър за видимата светлина. Двете измервания се използват за изчисляване на *In Vitro* балова оценка за дразнещото действие (ИВБОДД), която се използва за *in vitro* категоризиране според класификацията по степен на опасност от дразнещо действие за прогнозиране на *in vivo* потенциала за дразнещо действие върху очите на изпитваното вещество (вж. критериите за решението).

▼M2

12. За метода за изпитване НПГР се използва изолирана роговица от очите на прясно заклан едър рогат добитък. Непрозрачността на роговицата се измерва количествено чрез количеството на светлопреминаването през роговицата. Пропускливостта се измерва количествено като количеството натриев флуоресцентен оцветител, което преминава през цялата дебелина на роговицата, отчетено в средата в задното отделение. Изпитваното вещество се нанася върху епителиалната повърхност на роговицата чрез добавяне в предното отделение на държателя за роговицата. В Допълнение 3 са дадени описание и схема на държател за роговицата, използван за анализа за НПГР. 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

13. 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 НПГР 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.

14. 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 μm, докато роговица с хоризонтален диаметър < 28,5 mm и дебелина в средата на роговицата CCT < 900 μm 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 отчетените за очи на възрастен добитък. Все пак се допуска да се използва роговица от млади животни (напр. на възраст от 6 до 12 месеца), тъй като това дава някои предимства, като по-лесното набавяне, по-малкия възрастов диапазон и намалената опасност, свързана с потенциалната възможност работещите да бъдат заразени със спонгиформна енцефалопатия по едрия рогат добитък (15). Тъй като ще бъде от полза да продължи оценката на ефекта от размерите или дебелината на роговицата върху реакцията срещу вещества с корозивно и дразнещо действие, потребителите се приканват да докладват за предполагаемата възраст и/или тегло на животните, от които се доставя използваната в изследването роговица.

Събиране и транспортиране на очите до лабораторията

15. Очите се събират от работещите в кланицата. За да се сведат до минимум механичните и други видове увреждания на очите, те следва да се извадят възможно най-скоро след настъпване на смъртта. За да се избегне излагането на очите на въздействието на вещества с потенциално дразнещо действие, работещите в кланицата не трябва да използват почистващи препарати при миенето на главите на животните.

16. Очите следва да бъдат изцяло потопени в балансиран солен разтвор на Ханкс (HBSS) в съд с подходящи размери и транспортирани до лабораторията по начин, който позволява да бъдат сведени до минимум развалянето и/или бактериалното замърсяване. Тъй като очите се вземат по време на кланичния процес, те може да са покрити с кръв и други биологични вещества, 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 постави върху мокър лед, като към балансирания солен разтвор на Ханкс, в който се съхраняват очите по време на транспорта, се добавят антибиотици (напр. 100 IU/mL пеницилин и 100 mg/mL стрептомицин]).

▼M2

17. Интервалът от време между вземането на очите и използването на роговицата за метода НПГР следва да бъде сведен до минимум (обикновено вземането и използването става в рамките на един и същ ден) и следва убедително да се покаже, че не компрометира резултатите от анализа. Тези резултати се базират на критериите за подбор на очите, както и на реакцията на положителната и отрицателната контрола. Всички очи, използвани за анализа, следва да бъдат от една и съща група очи, взета през даден ден.

Критерии за избор на очи, използвани за метода НПГР

18. След пристигане в лабораторията очите се оглеждат внимателно за дефекти, включително за повишена непрозрачност, драскотини и неоваскуларизация. Използват се само роговици от очи без такива дефекти.

19. Качеството на всяка роговица се оценява също и на по-късните етапи в анализа. Роговици с непрозрачност по-голяма от седем единици (забележка: уредът за измерване на непрозрачност следва да бъде калибриран с еталони за непрозрачност, използвани за установяване на единиците непрозрачност, вж. Допълнение 3), след първия един час време за уравновесяване се изхвърлят.

20. Всяка третирана група (изпитвано вещество, съответни отрицателна и положителна контроли) се състои от минимум три очи. За отрицателната контрола в анализа за НПГР 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 отрицателната контрола се използват за коригиране на стойностите за непрозрачност и пропускливост на роговицата от изпитваната проба и от положителната контрола – третираната роговица при изчисляването на *In Vitro* балова оценка за дразнещото действие (ИВБОДД).

ПРОЦЕДУРА

Подготовка на очите

21. 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 епителия и ендотелия на роговицата. Изолираните роговици се поставят в специално изработени държатели, които имат предно и задно отделение, които са съответно откъм епителиалната и ендотелиалната страна на роговицата. Двете отделения са пълни до преливане с предварително затоплена среда EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (първо задното отделение), като се внимава да няма мехури. След това уредът се уравновесява при 32 ± 1 °C в продължение на най-малко един час, за да може роговицата да се уравновеси със средата и да се достигне до нормална метаболитна дейност в степента, в която това е възможно (приблизителната температура на повърхността на роговицата *in vivo* е 32 °C).

22. След периода на уравновесяване в двете отделения се добавя прясна предварително затоплена среда EMEM и се отчитат базовите стойности за непрозрачност за всяка роговица. Роговици с макроскопични тъканни увреждания (напр. драскотини, пигментация, неоваскуларизация) или непрозрачност > 7 единици се изхвърлят. Изчислява се средната непрозрачност за всички уравновесени роговици. Най-малко три роговици със стойности за непрозрачност близки до средната за всички роговици се избират за отрицателна контрола (или контрола само с разтворител). Останалите роговици се разпределят на групи за опитно третиране и за положителна контрола.

▼M2

23. Тъй като топлинният капацитет на водата е по-висок от този на въздуха, водата осигурява по-стабилни температурни условия за инкубация. Поради това, препоръчва се 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 постоянна (напр. като се затоплят предварително държателят и средата).

Прилагане на изпитваното вещество

24. Използват се два различни протокола за третиране – един за течности и повърхностно активни вещества (твърди или течни) и един за повърхностно неактивни твърди вещества.

25. Течностите се изпитват неразредени, докато повърхностно активните вещества 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 тестовата система. Полутвърди вещества, кремообразни вещества и парафините обикновено се изпитват във вид на течности. За използване на други концентрации при разреждане следва да се направи подходяща аргументация. Роговицата се експонира на течностите или повърхностно активните вещества в продължение на 10 минути. Използването на друга продължителност на експозицията следва да бъде придружено от подходяща научна обосновка.

26. Повърхностно неактивните твърди вещества обикновено се изпитват във вид на разтвори или суспензии при 20 % концентрация в 0,9 % разтвор на натриев хлорид, дестилирана вода или друг разтворител, за който е доказано, че не влияе неблагоприятно върху тестваната система. При някои обстоятелства и подходящо научно обосноваване 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 29). Роговицата се експонира на твърдите вещества в продължение на четири часа, но както и при течностите и повърхностно активните вещества, при подходяща научна обосновка може да се приложи и друга продължителност на експозицията.

27. В зависимост от физичната природа и химичните характеристики на изпитваното вещество (напр. твърди вещества, течности, вискозни или невискозни течности) могат да се използват различни методи на третиране. Критичният фактор е да се осигури изпитваното вещество да покрива добре епителиалната повърхност и да бъде подходящо отстранено при етапите на измиване. Когато изпитваните вещества са невискозни или слабо вискозни течности, обикновено се използва методът със затворено отделение, а когато изпитваните вещества са полувискозни и вискозни течности и твърди вещества в чист вид — обикновено се използва методът с отворено отделение.

28. При метода със затворено отделение през отворите за дозиране върху горната повърхност в предното отделение се въвежда достатъчно количество от изпитваното вещество (750 μL), така че да покрие епителиалната 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 изпитваното вещество в продължение на съответния период от време.

29. При метода с отворено отделение пръстенът за затваряне на прозореца и стъкленият прозорец се отстраняват от предното отделение преди третирането. Контролното или изпитваното вещество (750 μL или такова количество от изпитваното вещество, което е достатъчно за да покрие напълно роговицата) се прилагат непосредствено върху епителиалната повърхност на роговицата, като се използва микропипета. Ако е трудно изпитваното вещество да се вземе с пипета, то може да се зареди под налягане в нагнетателна пипета за улесняване на дозирането. Краят на нагнетателната пипета се поставя в отворения край на спринцовката, за да може материалът да бъде зареден в нагнетателния край под налягане. 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 материал се изважда (отстранява) и процесът се повтаря, докато краят се запълни без въздушни мехури. Ако е необходимо, може да се използва нормална спринцовка (без игла), тъй като тя позволява да се измери точно обемът на изпитваното вещество и по-лесното му нанасяне по епителиалната повърхност на роговицата. След дозирането стъкленият прозорец се поставя отново на предното отделение, за да се затвори системата.

▼M2

Инкубация след експозиция

30. След изтичане на времето за експозиция, изпитваното вещество, отрицателното контролно вещество или положителното контролно вещество се отстраняват от предното отделение и епителият се измива със средата EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (съдържаща червен фенол) най-малко три пъти (или докато не останат видими следи от изпитваното вещество). Средата със съдържание на червен фенол се използва за измиване, защото може да се наблюдава промяната на цвета на червения фенол, за да се определи ефективността на измиващите алкални или киселинни материали. Роговиците се измиват повече от три пъти ако червеният фенол продължава да променя цевта си (до жълто или лилаво) или ако още има видими следи от изпитваното вещество. След като средата бъде изчистена от изпитваното вещество, роговиците се измиват за последен път със средата EMEM (без червен фенол). EMEM (без червен фенол) се използва за последното измиване, за да се осигури отстраняването на червения фенол от предното отделение преди да се направи измерването за непрозрачност. След това предното отделение се пълни отново с прясна среда EMEM без червен фенол.

31. При течности или повърхностно активни вещества след измиването роговиците се подлагат на инкубация за още два часа при 32 ± 1 °C. В някои случаи може да е полезно да се удължи следекспозиционното време 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.

32. В края на периода на следекспозиционна инкубация за течности и повърхностно активни вещества и в края на четиричасовата експозиция за повърхностно неактивни твърди вещества се отчитат непрозрачността и пропускливостта на всяка роговица. Също така се прави визуален оглед на всяка роговица и се записват съответните наблюдения (напр. обелване на тъканта, остатъци от изпитваното вещество, неравномерна непрозрачност). Тези наблюдения могат да бъдат важни, тъй като могат да се отразят като колебания в отчетените стойности от уреда за измерване на непрозрачност.

Контроли

33. Във всеки експеримент се включват паралелни отрицателни или контроли „разтворител/носител“ и положителни контроли.

34. Когато се изпитва течно вещество със 100 % концентрация, в метода за изпитване НПГР се включва паралелна отрицателна контрола (напр. 0,9 % разтвор на натриев хлорид или дестилирана вода), за откриване на неспецифични промени в тестовата система и за осигуряване на базова линия за крайните резултати от анализа. Също така, тя осигурява проверка, че не се причинява дразнителна реакция от неподходящи условия при провеждания опит.

35. Когато се изпитва разредена течност, повърхностно активно вещество или твърдо вещество, в метода за изпитване НПГР се включва паралелна контролна група „разтворител/носител“ за откриване на неспецифични промени в тестовата система и за осигуряване на базова линия за крайните резултати от анализа. Може да се използва само разтворител/носител, за който е доказано, че не влияе неблагоприятно върху тестовата система.

36. Във всеки експеримент се включва известно вещество с дразнещо действие върху очите като паралелна положителна контрола за удостоверяване индуцирането на съответната реакция. Тъй като при този метод за изпитване анализът на НПГР се използва за определяне на вещества с корозивно или силно дразнещо действие, най-добре би било положителната контрола да е еталонно вещество, което при този метод за изпитване индуцира остра реакция. Все пак, за да се осигури да може да се направи оценка на измененията във времето на реакцията на положителната контрола, силата на реакцията срещу веществото с дразнещо действие не следва да е прекомерно голяма.

37. Примери за положителни контроли за течни изпитвани вещества са диметилформамид или 1 % натриева основа. Пример за положителна контрола за твърди изпитвани вещества е 20 % (w/v) имидазол в 0,9 % разтвор на натриев хлорид.

▼M2

38. Сравнителните контролни вещества са от полза за оценката на потенциала за дразнещо действие върху очите на неизвестни химикали от конкретен химичен или продуктов клас, или за оценка на съответния потенциал за дразнещо действие на вещества с дразнещо действие върху очите в рамките на конкретен диапазон от реакции на дразнене.

Измерени крайни резултати

39. Непрозрачността се определя от количеството на светлопреминаването през роговицата. Непрозрачността на роговицата се измерва количествено с помощта на уред за измерване на непрозрачност, при което се получават стойности за непрозрачността, измерени по непрекъсната скала.

40. Пропускливостта се определя от количеството натриев флуоресцеинов оцветител, което прониква през всички клетъчни слоеве на роговицата (т.е. от епителия по външната повърхност на роговицата до ендотелия по вътрешната повърхност на роговицата). 1 mL натриев флуоресцентен оцветител (4 или 5 mg/mL когато се изпитват съответно течности и повърхностно активни твърди вещества или повърхностно неактивни твърди вещества) се поставя в предното отделение на държателя за роговицата, в което се помества епителиалната страна на роговицата, докато задното отделение, в което се помества ендотелиалната страна на роговицата се пълни с прясна среда EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium). 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, съответстващи на 490 nm, се отчитат като стойности за оптичната плътност (OD_{490}) или за абсорбцията, които се измерват по непрекъсната скала. Стойностите за пропускливостта на флуоресцеина се определят като се използват стойностите OD_{490} на базата на спектрофотометър за видимата светлина, използващ стандартен ход на светлината от 1 cm.

41. Друга възможност е да се използва четец на 96-гнездна микротитърна плоча, при условие че: (i) може да се определи линейният диапазон на четеца с плочата за определяне на OD_{490} стойностите за флуоресцеина; 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 360mL]).

ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

Оценка на данните

42. 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 емпирично получена 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) са докладвали, че тази формула е изведена по време на вътрешни 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 се вписва между *in vivo* и *in vitro* данните. Този анализ е извършен от учени в две различни компании, които извеждат почти еднакви формули.

43. Стойностите за непрозрачност и пропускливост следва да се оценяват и независимо, за да се определи дали дадено изпитвано вещество индуцира корозивност или силно дразнене само чрез един от двата крайни резултата (вж. критериите за решението).

▼M2

Критерии за формулирането на решение

44. Вещество, което индуцира ИВБОДД ≥ 55,1 се определя като вещество с корозивно или силно дразнещо действие. Както бе споменато в точка 1, когато изпитваното вещество не се определи като вещество с корозивно или силно дразнещо действие върху очите, следва да бъдат проведени допълнителни изпитания за целите на класифицирането и етикетирането. Методът за изпитване НПГР е с обща точност от 79 % (113/143) до 81 % (119/147), неверни положителни резултати 19 % (20/103) до 21 % (22/103), и неверни отрицателни резултати 16 % (7/43) до 25 % (10/40), в сравнение с данните от *in vivo* метода за изпитване със заешки очи, класифицирани по системите за класифициране на EPA (1), EU (2), или GHS (3). Когато от базата данни бъдат изключени вещества от определени химични (напр. алкохоли, кетони) или физични (напр. твърди вещества) класове, точността на метода НПГР в системите за класифициране на EU, EPA, и GHS варира от 87 % (72/83) до 92 % (78/85), неверните положителни резултати варират от 12 % (7/58) до 16 % (9/56), а неверните отрицателни резултати — от 0 % (0/27) до 12 % (3/26).

45. Дори когато дадено изпитвано вещество не получи класификация като вещество с корозивно или силно дразнещо действие върху очите, данните от анализа за НПГР могат да бъдат от полза съвместно с данните от *in vivo* изпитанията със заешки очи или от съответно валидирани *in vitro* изпитания за по-нататъшната оценка на ползата и ограниченията на метода за изследване НПГР за определяне на вещества без силно дразнещо действие и без дразнещо действие (в процес на разработване е Ръководство за използването на *in vitro* метод за изпитване за токсично действие върху очите).

Критерии за приемане на изпитанието

46. Едно изпитание се смята за приемливо когато положителната контрола дава оценка ИВБОДД, попадаща в границите между две стандартни отклонения от текущата средна стойност за предишни изследвания, която се актуализира най-малко на всеки три месеца, или всеки път когато в лаборатории, в които рядко се провеждат изпитания (напр. по-рядко от веднъж месечно), бъде проведено приемливо изпитание. Реакциите от отрицателната контрола или от контролата „разтворител/носител“ следва да дават резултати със стойности за непрозрачност и пропускливост, които са по-ниски от установените горни граници за стойностите за фонова непрозрачност и пропускливост за говежда роговица, третирана със съответната отрицателна контрола или контрола „разтворител/носител“.

Доклад за теста

47. Докладът за теста следва да включва следната информация, когато тя се отнася за провеждането на изпитанието:

Изпитвани и контролни вещества

Наименование(-я) на химикала, като например структурното наименование, използвано от Службата CAS, следвано от други наименования, ако са известни такива наименования;

Регистрационен номер CAS (RN), ако е известен;

Чистота и състав на веществото или сместа (в тегловни проценти), доколкото се разполага с такава информация;

Физикохимични свойства, като например физично състояние, летливост, киселинност, устойчивост, химичен клас, водоразтворимост, отнасящи се до проведеното изследване;

Обработка на изпитваните/контролни вещества преди изпитанието, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);

Устойчивост, ако е известна.

▼**M2**

Информация за финансиращото лице и за изпитателната лаборатория

Име и адрес на финансиращото лице, на изпитателната лаборатория и на ръководителя на изследването;

Идентификация на източника на очите (напр. кланицата, от която са взети);

Условия на съхранение и транспорт на очите (напр. дата и час на вземане, период от време преди започване на изпитанието, среда и температурни условия, в които са транспортирани, използвани антибиотици);

Ако са налични, специфичните характеристики на животните, от които са взетите очи (напр. възраст, пол, тегло на животното - донор).

Аргументация на използваните методи за изпитване и протокол

Адекватност на метода за изпитване

Процедурата, използвана за осигуряване на адекватност (напр. точност и надеждност) на метода за изпитване във времето (напр. периодично изпитване на опитни вещества, използване на отрицателни и положителни контролни данни от предишни изпитания).

Критерии за приемане на изпитанието

Приемливи съответни положителни и отрицателни контролни диапазони, основани на данни от предишни изпитания;

Ако са приложими, приемливи съответни сравнителни контролни диапазони, основани на данни от предишни изпитания.

Тестови условия

Описание на използваната тестова система;

Вид на използвания държател за роговицата;

Информация за калибровката на уредите, използвани за измерване на непрозрачност и пропускливост (напр. уред за измерване на непрозрачност и спектрофотометър);

Информация за използваните говежди роговици, включително декларация за качеството им;

Подробности за използваната процедура за изпитване;

Използвани концентрации на изпитваното вещество;

Описание на евентуални модификации на процедурата за изпитване;

Позоваване на данни от предишни изпитания на модела (напр. отрицателни и положителни контроли, опитни вещества, сравнителни контролни вещества);

Описание на използваните критерии за оценка.

Резултати

Таблици с данни за отделни изпитвани проби (напр. стойности за непрозрачност и OD_{490} и изчислени оценки ИВБОДД за изпитваното вещество и положителните, отрицателните и сравнителни контроли (ако са включени), докладвани в табличен вид, включително данни от повторни експерименти, когато е приложимо, и средни стойности ± стандартното отклонение за всеки експеримент);

Описание на други наблюдавани ефекти.

Обсъждане на резултатите

Заключение

ЛИТЕРАТУРА

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

▼M2

(2) 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/ЕС и за изменение на Регламент (ЕО) № 1907/2006. ОВ L 353, 31.12.2008 г., стр. 1.

(3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007.На разположение на адрес:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/-02files_e.html]

(4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. На разположение на адрес:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(5) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre 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_tmer.htm]

(6) 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.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. На разположение на адрес:

[http://www.oecd.org/document/40/-0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.htm l]

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre 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_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. На разположение на адрес:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/-ocu_brd_ice.htm]

(10) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

▼**M2**

(11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. На разположение на адрес:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

(13) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.

(17) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. На разположение на адрес:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/-ocu_brd_bcop.htm]

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. На разположение на адрес:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: Близостта до съответствие между резултатите от метода за изпитване и приетите еталонни стойности. Тя е мярка за функционалните характеристики на метода за изпитване и един аспект на „приложимостта“. Често терминът се използва взаимозаменяемо със „съгласуваност“, и означава делът на правилните резултати от даден метод за изпитване.

Сравнително контролно вещество: Вещество, използвано като норма за сравнение с изпитваното вещество. Едно сравнително контролно вещество следва да притежава следните свойства; (i) постоянен и надежден източник(-ци); (ii) структурно и функционално сходство с класа на изпитваните вещества; (iii) известни физични/химични характеристики; (iv) потвърждаващи данни за известни въздействия, и (v) известна ефективност за постигане на желаната реакция.

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 експониране на въздействието на изпитваното вещество. Повишената непрозрачност на роговицата е показател за увреждане на роговицата. Непрозрачността може да се оценява субективно, както това става в изпитването Draize със заешки очи, или обективно с инструмент, наречен „уред за измерване на непрозрачност.“

Пропускливост на роговицата: Количествена мярка за увреждане на епителия на роговицата чрез определяне на количеството натриев флуоресцеинов оцветител, преминаващо през всички клетъчни слоеве на роговицата.

Категория 1 на EPA: Корозивно въздействие (необратимо разрушаване на очната тъкан), или въздействие върху роговицата, или дразнене, траещи повече от 21 дни (1).

Категория R41 на ЕС: Получаване на тъканно увреждане на окото или сериозно физическо влошаване на зрението след прилагане на изпитваното вещество по предната повърхност на окото, което не е напълно обратимо в рамките на 21 дни след прилагането (2).

Дял на неверните отрицателни резултати: Пропорцията на всички невярно определени отрицателни резултати по даден метод за изпитване относно вещества, предизвикващи положителен резултат. Това е един показател за функционалните характеристики на метода за изпитване.

Дял на неверните положителни резултати: Пропорцията на всички невярно определени положителни резултати по даден метод за изпитване относно вещества, предизвикващи отрицателен резултат. Това е един показател за функционалните характеристики на метода за изпитване.

GHS (Глобална хармонизирана система за класифициране и етикетиране на химикали): 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, съобщения за опасност, съобщения за предпазни мерки 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 (3).

▼M2

Категория 1 по GHS: Получаване на тъканно увреждане на окото или сериозно физическо влошаване на зрението след прилагане на изпитваното вещество по предната повърхност на окото, което не е напълно обратимо в рамките на 21 дни след прилагането (3).

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.

***In Vitro* балова оценка за дразнещо действие (ИВБОДД):** Емпирично получена формула, използвана в анализа за НПГР, при която средните стойности за непрозрачност и пропускливост за всяка третирана група се комбинират в една *in vitro* балова оценка за всяка третирана група. ИВБОДД = средната стойност за непрозрачност + (15 x средната стойност за пропускливост).

Отрицателна контрола: Нетретирано точно копие, съдържащо всички компоненти на дадена тестова система. Тази проба се провежда паралелно с проби, третирани с изпитваното вещество, и с други контролни проби, за определяне доколко разтворителят взаимодейства с тестовата система.

Вещество без дразнещо действие: Веществата, които не се класифицират като вещества с дразнещо действие върху очите от Категории I, II, или III на EPA; Категории R41 или R36 на ЕС; или Категории 1, 2A, или 2B на GHS.

Вещество с корозивно действие върху очите: (а) Вещество, което причинява необратимо тъканно увреждане на окото; (б) Вещества, които се класифицират като вещества с дразнещо действие върху очите от Категория 1 на GHS, Категория I на EPA, или Категория R41 на ЕС (1) (2) (3).

Вещество с дразнещо действие върху очите: (а) Вещество, което причинява обратимо изменение на окото след прилагане върху предната повърхност на окото; (б) Вещества, които се класифицират като вещества с дразнещо действие върху очите от Категория II или III на EPA, Категория R36 на ЕС, или Категория 2A или 2B на GHS (1) (2) (3).

Вещество със силно дразнещо действие върху очите: (а) Вещество, което причинява тъканно увреждане на окото след прилагане върху предната повърхност на окото, което не преминава до 21 дни след прилагането или причинява сериозно физическо влошаване на зрението; (б) Вещества, които се класифицират като вещества с дразнещо действие върху очите от Категория 1 на GHS, Категория I на EPA, или Категория R41 на ЕС (1) (2) (3).

Уред за измерване на 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 друга фотоклетка през експерименталното отделение, в което се намира отделението с роговицата. Разликата в пропусканата през фотоклетките светлина се сравнява и на цифровия екран се изписва цифрова стойност за непрозрачността.

Положителна контрола: Точно копие, съдържащо всички компоненти на дадена тестова система и третирано с вещество, за което е известно, че индуцира положителна реакция. За да се осигури да може да се направи оценка на измененията във времето на реакцията на положителната контрола, силата на острата реакция не следва да е прекомерно голяма.

▼M2

Надеждност: Мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да бъде провеждан възпроизводимо във времето в рамките на и между различни лаборатории, когато за провеждането му се използва един и същ протокол. Оценката за нея се прави като се изчислява между- и вътрешнолабораторната възпроизводимост и междулабораторната повторяемост.

Контрола „разтворител/носител“: Нетретирана проба, съдържаща всички компоненти на дадена тестова система, включително разтворителя или носителя, която е третирана с проби, обработени с изпитваното вещество, и с други контролни проби, за определяне на базовата реакция на обработените проби с изпитваното вещество, разтворено в същия разтворител или носител. Когато се изпитва с паралелна отрицателна контрола, тази проба показва също доколко разтворителят или носителят взаимодействат с тестовата система.

Поетапно изпитване: Стратегия за стъпаловидно изпитване, при която цялата съществуваща информация за дадено изпитвано вещество се разглежда по конкретен ред, като на всеки етап се оценява значимостта на данните — за определяне доколко съществува достатъчно информация, за да се вземе решение за класифициране на веществото като опасно, преди да се премине към следващия етап. Ако дадено изпитвано вещество може да се определи като вещество с потенциално дразнещо действие въз основа на съществуващата информация, не се налага допълнително изпитване. Ако дадено изпитвано вещество не може да се определи като вещество с потенциално дразнещо действие въз основа на съществуващата информация се провежда процедура за поетапно последователно изпитване върху животни, докато стане възможно да се направи недвусмислена класификация.

Валидиран метод за изпитване: Метод за изпитване, за който са извършени валидиращи изследвания 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 функционални характеристики по отношение на точността и надеждността си, за да се счита за приложим за предлаганата цел.

Оценяване на значимостта на данните: Процесът на отчитане на силните и слаби страни на различни видове информация за достигане до и в подкрепа на дадено заключение относно потенциалната опасност на едно вещество.

▼**M2**

Допълнение 2

Опитни вещества за метода за изпитване НПГР

Преди редовно използване на метод за изпитване, който се придържа към настоящия, лабораториите могат да докажат техническа компетентност като правилно определят класификацията за корозивно действие върху очите за 10-те вещества, препоръчани в Таблица 1. Тези вещества са подбрани като представителни за редица реакции на локално дразнещо/корозивно действие върху окото, въз основа на резултати от *in vivo* изпитване със заешки очи (TG 405) (т.е. Категории 1, 2A, 2B, или Некласифицирано и неетикетирано съгласно глобалната система на ОН GHS (3) (7). От друга страна, предвид валидираното предназначение на тези анализи (т.е. за определяне само на вещества с корозивно/ силно дразнещо действие върху очите), съществуват само два възможни тестови резултата за целите на класифицирането, с които да се докаже компетентност (вещества с корозивно/силно дразнещо действие или вещества без корозивно/силно дразнещо действие). Други критерии, които бяха използвани за подбор на посочените вещества са: наличието на веществата на пазара, съществуването на висококачествени *in vivo* еталонни данни и съществуването на висококачествени данни от двата метода *in vitro*, за които се разработва Ръководство за изпитване. Поради тази причина, веществата с дразнещо действие са подбрани от препоръчителния списък на ICCVAM с 122 еталонни вещества за валидиране на *in vitro* методи за изпитване на токсичност върху очите (вж. Допълнение H: Препоръчителни еталонни вещества на ICCVAM) (5). Еталонните данни са дадени в документацията на ICCVAM за метода за изпитване НПГР и метода с изолирани птичи очи (ИПО) (17) (18).

Таблица 1

Препоръчвани вещества за доказване на техническа опитност по отношение на НПГР

Вещество	CASRN	Химичен клас ([1])	Физична форма	*In Vivo* Класификация ([2])	*In Vitro* Класификация ([3])
Бензалкониев хлорид (5 %)	8001-54-5	Ониево съединение	Течност	Категория 1	Вещество с корозивно/силно дразнещо действие
Хлорхексидин	55-56-1	Амин, Амидин	Твърдо вещество	Категория 1	Вещество с корозивно/силно дразнещо действие
Дибензоил-L-винена киселина	2743-38-6	Карбоксилна киселина, естер	Твърдо вещество	Категория 1	Вещество с корозивно/силно дразнещо действие
Имидазол	288-32-4	Хетероциклен	Твърдо вещество	Категория 1	Вещество с корозивно/силно дразнещо действие
Трихлороацетилова киселина (30 %)	76-03-9	Карбонова киселина	Течност	Категория 1	Вещество с корозивно/силно дразнещо действие
2,6-Дихлоробензоил хлорид	4659-45-4	Киселинен халид	Течност	Категория 2A	Вещество без корозивно/силно дразнещо действие
Етил-2-метил ацетоацетат	609-14-3	Кетон, естер	Течност	Категория 2B	Вещество без корозивно/силно дразнещо действие
Амониев нитрат	6484-52-2	Неорганична сол	Твърдо вещество	Категория 2A	Вещество без корозивно/силно дразнещо действие

▼**M2**

Вещество	CASRN	Химичен клас ([1])	Физична форма	*In Vivo* Класификация ([2])	*In Vitro* Класификация ([3])
Глицерин	56-81-5	Алкохол	Течност	Неетикетирано	Вещество без корозивно/силно дразнещо действие
n-Хексан	110-54-3	Въглеводород (ацикличен)	Течност	Неетикетирано	Вещество без корозивно/силно дразнещо действие

Съкращения: CASRN = Номер по регистъра на справочната служба по химикали

([1]) За всяко изпитвано вещество е определен химичен клас, 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 (ОИСР TG 405) и се използва глобалната система GHS на ОН (3)(7).

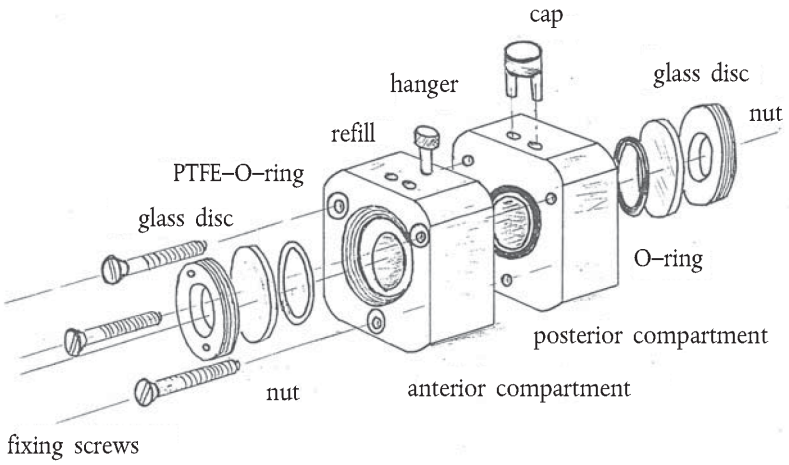
([3]) Базира се на резултати от изпитване за НПГР и ИПО.

▼M2

Допълнение 3

ДЪРЖАТЕЛ ЗА РОГОВИЦА ЗА НПГР

1. Държателите за роговицата за НПГР са изработени от инертен материал (напр. полипропилен). Държателите се състоят от две части (предно и задно отделение) и имат две сходни цилиндрични вътрешни отделения. Всяко отделение е с вместимост 5 mL и завършва със стъклен прозорец, през който се отчитат стойностите за непрозрачността. Всяко от вътрешните отделения е с диаметър 1,7 cm и дълбочина 2,2 cm ([1]). За да се избегнат течове се използва О-пръстен, разположен върху задното отделение. Роговиците се поставят с ендотелиалната страна надолу върху О-пръстена на задните отделения, а предните отделения се поставят върху епителиалната страна на роговиците. Отделенията се закрепват с три неръждаеми винта, разположени по външните краища на отделението. В края на всяко отделение се намира стъклен прозорец, който може да се сваля за улесняване достъпа до роговицата. Между стъкления прозорец и отделението също е поставен О-пръстен за защита от течове. Два отвора върху горната страна на всяко отделение позволяват поставяне и изваждане на средата и на изпитваните съединения. По време на третирането и инкубацията те се затварят с гумени капачки.



Превод на надписите на фигурата:

Glass disc: Стъклен диск

PTFE-O-ring: политетрафлуороетиленов О-пръстен

Refill: отвор за пълнене

Hanger: кука

Cap: капачка

Nut: гайка

O-ring: О-пръстен

Posterior compartment: задно отделение

Anterior compartment: предно отделение

Fixing screws: застопоряващи винтове

([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 осигури стойностите за пропускливост да бъдат правилно определени за изчисляването на ИВБОДД по предлаганата формула.

▼**M2**

УРЕДЪТ ЗА ИЗМЕРВАНЕ НА НЕПРОЗРАЧНОСТ

2. Уредът за измерване на непрозрачност е инструмент за измерване на пропусканата светлина. 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 друга фотоклетка през експерименталното отделение, в което се намира отделението с роговицата. Разликата в пропусканата през фотоклетките светлина се сравнява и на цифровия екран се изписва цифрова стойност за непрозрачността. Определят се единиците за непрозрачност.

3. Уредът за измерване на непрозрачност следва да реагира линейно, като отчита диапазон от стойности за непрозрачността, който обхваща референтните стойности, използвани за различните класификации, описани в Прогнозния модел (т.е. до референтната стойност, която определя корозивното/силно дразнещото действие). За да се гарантират линейно и точно отчетени стойности до 75-80 единици непрозрачност е необходимо уредът да се калибрира като се използва серия от калибри. Калибрите (непрозрачни полиестерни листове) се поставят в калибриращото отделение (отделение за роговицата, предназначено за поставяне на калибрите) и се отчитат с уреда за измерване на непрозрачност. Калибриращата камера е предвидена да помества калибрите на приблизително същото разстояние между източника на светлината и фотоклетката, на което се разполагат роговиците по време на измерването за непрозрачност. Уредът за измерване на непрозрачност най-напред се калибрира за 0 единици непрозрачност като се използва калибриращото отделение без калибър. След това в калибриращото отделение последователно се поставят три различни калибри и се измерва непрозрачността им. Калибри 1, 2 и 3 следва да дават стойности за непрозрачността равни на зададените им съответно 75, 150, и 225 единици ± 5 %.

▼M2

Б. 48 МЕТОД ЗА ИЗПИТВАНЕ С ИЗОЛИРАНИ ПТИЧИ ОЧИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВЕЩЕСТВА С КОРОЗИВНО И СИЛНО ДРАЗНЕЩО ДЕЙСТВИЕ ВЪРХУ ОЧИТЕ

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Методът за изпитване с изолирани птичи очи (ИПО) е *in vitro* метод за изпитване, който може да се използва при определени обстоятелства и със специфични ограничения за класифициране на вещества и смеси с корозивно и силно дразнещо действие върху очите, (1) (2) (3). За целите на този метод за изпитване, като вещества със силно дразнещо действие се дефинират такива, които предизвикват лезии върху очите на заек, продължаващи най-малко 21 дни след прилагането. Въпреки че не се смята за валиден като пълен заместител на *in vivo* тестът върху заешки очи, методът с ИПО се препоръчва да се използва като част от една поетапна стратегия за изпитване за регулаторно класифициране и етикетиране в обхвата на конкретна област на приложимост (4) (5). Изпитваните вещества и смеси (6), които реагират положително на този анализ, могат да се класифицират като вещества с корозивно или силно дразнещо действие върху очите без по-нататъшно изпитване при зайци. Вещества, които покажат отрицателен резултат, е необходимо да се изпитват при зайци като се прилага стратегия за последователно изпитване, както това е разгледано в Ръководството за изпитания на ОИСР 405 (7) (глава Б.5 в настоящото приложение).

2. Целта на този метод за изпитване е да се опишат процедурите, използвани за оценка на потенциалното корозивно или силно дразнещо действие върху очите на изпитваното вещество, измерени чрез способността му да индуцира токсичност върху извадени птичи очи. Токсичният ефект върху роговицата се измерва чрез: (i) качествена оценка на непрозрачността, (ii) качествена оценка на увреждането на епителия при прилагане върху окото на флуоресцентен оцветител (задържане на флуоресцентен оцветител), (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 експониране на изпитваното вещество се определят поотделно, след което се комбинират, за да се направи Класификация за дразнещо действие върху очите.

3. Вещества с дразнещо действие върху очите, предизвикващи лезии, които преминават за по-малко от 21 дни на вещества без дразнещо действие са изпитвани също и по метода на изпитване с ИПО. Въпреки това, не е направена официална оценка за точността и надеждността на метода за изпитване с ИПО за тези категории вещества.

4. Определенията са дадени в Допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

5. Този метод за изпитване се базира на Протокола за метода за изпитване с ИПО (8) на Междуведомствения координационен комитет за валидиране на алтернативни методи (ICCVAM), който бе изготвен след едно международно изследване за валидиране (4) (5) (9), за което принос имаха Европейският център за валидиране на алтернативни методи, Японският център за валидиране на алтернативни методи и TNO Катедра „Качество на живот“ към 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).

▼M2

6. Установените ограничения на този метод за изпитване се базират на равнищата на неверните положителни резултати за алкохоли и равнищата на неверните отрицателни резултати за твърди и повърхностно активни вещества (вж. точка 47) (4). Когато веществата от този химичен и физичен клас бъдат изключени от базата данни, точността на ИПО навсякъде в системите за класификация на ЕС, EPA и Глобалната система за хармонизиране на класификацията на химични вещества и смеси GHS значително се подобрява (4). Според целта на този анализ (т.е. да се определят само веществата с корозивно/силно дразнещо действие върху очите) неверните отрицателни резултати не са от критично значение, тъй като такива вещества се тестват впоследствие при зайци или чрез други съответно валидирани *in vitro* изпитания в зависимост от регулаторните изисквания, като се прилага стратегия за последователно изпитване с подход, отчитащ значимостта на различните видове данни. Освен това текущата база данни за валидирането не позволяваше да бъде направена адекватна оценка на някои класове химикали или продукти (напр. смеси). Въпреки това изследователите биха могли да използват този метод за изпитване на всякакви видове материал (включително за смеси), като положителният резултат може да се приеме за показател за корозивно или силно дразнещо действие върху очите. Все пак положителни резултати, получени от алкохоли следва да се тълкуват предпазливо, поради риска от свръхпрогнозиране на опасност.

7. Всички процедури с птичи очи следва да съответстват на приложимите за изпитателната лаборатория разпоредби и процедури за работа с материали с хуманен или животински произход, които включват, но не се ограничават само с тъкани и тъканна течност. Препоръчва се спазването на универсалните лабораторни предпазни мерки (15).

8. Едно ограничение на метода за изпитване е фактът, че въпреки че той отчита някои от действията върху очите, изследвани с метода за изследване на дразнещо действие върху заешки очи, и до известна степен отчита и силата на това действие, той не взема под внимание увреждания на конюнктивата и ириса. Също така, въпреки че с метода за изпитване с ИПО не може да се направи оценка *per se* на обратимостта на лезиите върху роговицата, бе предложено въз основа на изследванията върху заешки очи оценката за първоначалната дълбочина на увреждането на роговицата да се използва за разграничаването на необратимото от обратимото действие (16). В заключение, методът за изпитване с ИПО не позволява да се направи оценка на потенциала за системно токсично действие, свързано с експонирането на очите.

9. Продължават усилията да се охарактеризират допълнително ползата и ограниченията на методът за изпитване с ИПО за определянето на вещества със слабо или без дразнещо действие (вж. също точка 48). Приканват се потребителите да предоставят на валидиращите организации проби и/или данни за официално оценяване на възможните бъдещи приложения на метода за изпитване с ИПО, включително и за определяне на вещества със слабо или без дразнещо действие върху очите.

10. Всяка лаборатория, която за първи път започва да извършва такива анализи, следва да използва опитните химикали, 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 анализа на ИПО за целите на регулаторното класифициране според степента на опасност.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

11. 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 изпитваното вещество, се оценява посредством определяне на подуването, непрозрачността и задържането на флуоресцеин 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 един общ Коефициент на дразнимост, или му се дава качествена категоризация, използвана за *in vitro* класификация на корозивно и силно дразнещо действие върху очите. След това всеки от тези резултати може да се използва за предвиждане на *in vivo* потенциала за корозивно и силно дразнещо действие върху очите на изпитваното вещество (вж. критериите за решението).

▼M2

Източник и възраст на птичите очи

12. Традиционно за този анализ се използват очи от птици, събрани в кланица 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.

13. 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 птицекланици (т.е. на възраст приблизително 7 седмици, 1,5 – 2,5 kg).

Събиране и транспортиране на очите до лабораторията

14. Главите следва да се отстраняват незабавно след сдиране 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 кланицата в лабораторията достатъчно бързо, за да се сведе до минимум влошаването и/или бактериалното замърсяване. Интервалът от време между събирането на птичите глави и използването на очите за метода за изпитване с ИПО следва да бъде сведен до минимум (обикновено до два часа) и следва убедително да се покаже, че не компрометира резултатите от анализа. Тези резултати се базират на критериите за подбор на очите, както и на реакцията на положителната и отрицателната контрола. Всички очи, използвани за анализа, следва да бъдат от една и съща група очи, събрани през даден ден.

15. Тъй като дисекцията на очите се извършва в лабораторията, целите глави се транспортират от кланицата при стайна температура в пластмасови кашони, овлажнени с кърпи, натопени в изотоничен солен разтвор.

Критерии за избор на очи, използвани за метода ИПО

16. Очите с високо базово флуоресцеиново оцветяване (напр. > 0,5) или с висока базова непрозрачност на роговицата (напр. > 0.5) след изваждане се изхвърлят.

17. Всяка третирана група и паралелна положителна контрола се състои от минимум три очи. Отрицателната контролна група или контролата „разтворител“ (ако се използва разтворител, различен от солен разтвор) се състои от минимум едно око.

ПРОЦЕДУРА

Подготовка на очите

18. 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. задържането на флуоресцеин и непрозрачността на роговицата трябва да са ≤ 0,5).

19. 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, деформирани от натиск).

20. Когато окото се извади от орбитата към него трябва да остане закрепена една 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.

▼M2

21. Изваденото око се поставя в скоба от неръждаема стомана, като роговицата се разполага вертикално. След това скобата се пренася в камерата на обливащ апарат (superfusion apparatus) (16). Лампите следва да бъдат разположени в обливащия апарат така че цялата роговица да може да се облее с изотоничния солен разтвор. Камерите на обливащия апарат трябва да бъдат с контролирана температура от 32 ± 1,5 °C. В Допълнение 3 е дадена схема на един типичен обливащ апарат и на скобите за очи, които могат да бъдат закупени или изработени. Апаратът може да се модифицира според нуждите на всяка лаборатория (напр. за побиране на различен брой очи).

22. 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 отпаднат на базата на някой от тези критерии, отпадат 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 отчитат различни стойности за дебелината на роговицата при различни настройки за шпалт-широчината. Шпалт-широчината следва да се настрои на 0,095 mm.

23. След като всички очи бъдат подложени на оглед и одобрени, те се инкубират в продължение на приблизително 45 до 60 минути за уравновесяване спрямо тестовата система преди дозиране. След периода на уравновесяване се извършва нулево еталонно замерване на дебелината и непрозрачността на роговицата, което да служи за база при отчитането (напр. време = 0). За базово измерване при отчитането на резултатите за поглъщането на флуоресцеин служи отчетената стойност по този показател по време на дисекцията.

Прилагане на изпитваното вещество

24. Непосредствено след нулевите еталонни замервания окото (в държателя му) се изважда от обливащия апарат като се поставя в хоризонтално положение и върху роговицата се прилага изпитваното вещество.

25. Течните изпитвани вещества обикновено се изпитват неразредени, но може да се разреждат ако това е необходимо (напр. като част от замисъла на изследването). Предпочитан разтворител за разреждане е физиологичният солен разтвор. Въпреки това, при контролирани условия могат да се използват и други разтворители, но трябва да се докаже уместността на разтворители, различни от физиологичния солен разтвор.

26. Течните изпитвани вещества се прилагат върху роговицата, така че цялата повърхност на роговицата да се покрие напълно с изпитваното вещество; стандартният обем е 0,03 mL.

27. Ако е възможно, твърдите вещества следва да бъдат натрошени възможно най-фино в хаван с чукало или подобно средство за натрошаване. Прахообразното вещество се прилага върху роговицата така че повърхността да се покрие равномерно с изпитваното вещество; стандартното количество е 0,03 g.

28. Изпитваното вещество (течно или твърдо) се прилага в продължение на 10 секунди и след това се отмива от окото с изотоничен солен разтвор (приблизително 20 mL) при стайна температура. След това окото (в държателя му) се връща в обливащия апарат в първоначалното му изправено положение.

Контроли

29. Във всеки експеримент се включват паралелни отрицателни или контроли „разтворител/носител“ и положителни контроли.

▼M2

30. 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 тестовата система и за да се осигури, че опитните условия няма да доведат до неподходяща дразнителна реакция.

31. Когато се изпитват разредени течности, в метода за изпитване се включва паралелна контролна група „разтворител/носител“ за откриване на неспецифични промени в тестовата система и за да се осигури, че опитните условия няма да доведат до неподходяща дразнителна реакция. Както е посочено в точка 25, може да се използва само разтворител/носител, за който е доказано, че не влияе неблагоприятно върху тестовата система.

32. Във всеки експеримент се включва известно вещество с дразнещо действие върху очите като паралелна положителна контрола за удостоверяване индуцирането на съответната реакция. Тъй като при този метод за изпитване анализът на ИПО се използва за определяне на вещества с корозивно или силно дразнещо действие, положителната контрола следва да е еталонно вещество, което при този метод за изпитване индуцира остра реакция. Все пак, за да се осигури да може да се направи оценка на измененията във времето на реакцията на положителната контрола, силата на острата реакция не следва да е прекомерно голяма. За положителната контрола следва да се генерират достатъчни *in vitro* данни, за да може да се изчисли статистически дефиниран приемлив диапазон за положителната контрола. Ако за конкретна положителна контрола няма на разположение достатъчно данни от предишни изпитания с метода за изпитване с ИПО, може да е необходимо да се проведат изследвания за набавяне на такава информация.

33. Примери за положителна контрола за течни изпитвани вещества са 10 % оцетна киселина или 5 % бензалкониев хлорид, докато примери за положителна контрола за твърди изпитвани вещества са натриев хидроокис или имидазол.

34. Контролните сравнителни вещества са от полза за оценката на потенциала за дразнещо действие върху очите на неизвестни химикали от конкретен химичен или продуктов клас, или за оценка на съответния потенциал за дразнещо действие на вещества с дразнещо действие върху очите в рамките на конкретен диапазон от реакции на дразнене.

Измерени крайни резултати

35. Обработените роговици се оценяват преди третирането и 30, 75, 120, 180, и 240 (± 5) минути след последващото третиране с отмиване. Тези времеви точки осигуряват необходимия брой замервания през четиричасовия период на третиране, като същевременно между отделните измервания остава достатъчно време да се направят необходимите наблюдения върху всички очи.

36. Крайните показатели, които се оценяват са непрозрачност на роговицата, подуване на роговицата, задържане на флуоресцеин и морфологични изменения (напр. образуване на вдлъбнатини или отпускане на епителия). Всички крайни резултати, с изключение на задържането на флуоресцеин (което се определя само преди третирането и 30 минути след експониране на изпитваното вещество) се определят във всяка от горните времеви точки.

37. Препоръчително е да се направят снимки за документиране на непрозрачността на роговицата, задържането на флуоресцеин, на морфологичните изменения и на хистопатологията, ако се провежда такова изследване

38. След заключителното изследване след четири часа е добре потребителите да съхранят очите в подходящ фиксатор (напр. неутрален буферен формалинов разтвор) за евентуално хистопатологично изследване.

▼**M2**

39. Подуването на роговицата се определя от измерванията на дебелината на роговицата, направени с оптичния пахиметър на микроскопа с шпалт-лампа. То се изразява процентно и се изчислява от измерванията на дебелината на роговицата по следната формула:

$$\left[\frac{\textit{дебелина на роговицата във време } t \; - \; \textit{дебелина на роговицата във време } t \; = \; 0}{\textit{дебелина на роговицата във време } t \; = \; 0}\right] \times 100$$

40. Средната процентна стойност за подуването 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 подуване на роговицата, отчетена в която и да е времева точка, се определя обща балова оценка на категоризация за всяко изпитвано вещество.

41. Непрозрачността на роговицата се изчислява като за отчитането се използва площта от роговицата, която е най-плътно непрозрачна. 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 всяко изпитвано вещество (Таблица 1).

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

42. Средната стойност за задържане на флуоресцеин за всички изпитвани очи се изчислява само за 30-минутната времева точка за отчитане, която се използва за определяне на общата балова оценка на категоризация за всяко изпитвано вещество (Таблица 2).

Таблица 2

Балови оценки за задържане на флуоресцеин

Балова оценка	Наблюдение
0	Липсва задържане на флуоресцеин
0,5	Много слабо едноклетъчно оцветяване
1	Едноклетъчно оцветяване, разпръснато по цялата третирана площ на роговицата
2	Фокално или сливащо се плътно едноклетъчно оцветяване
3	Сливащи се големи площи задържане на флуоресцеин в роговицата

▼M2

43. Морфологичните изменения включват „образуване на вдлъбнатини“ по епителните клетки на роговицата, „отпускане“ на епителия, „грапавост“ на повърхността на роговицата и „залепване“ на изпитваното вещество по роговицата. Тези наблюдавани изменения могат да са с различна тежест и да възникват едновременно. Класифицирането на тези наблюдения е субективно според интерпретацията на изследователя.

ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

Оценка на данните

44. Резултатите за непрозрачност на роговицата, подуване и задържане на флуоресцеин следва да бъдат оценени поотделно, за да се определи ИПО-клас за всеки краен резултат. След това ИПО-класовете за всеки краен резултат се комбинират, за да се направи Класификация за дразнещо действие за всяко изпитвано вещество.

Критерии за решението

45. След като се направи оценка на всеки краен резултат, могат да се определят ИПО-класовете на базата на един предварително зададен диапазон. Интерпретирането на дебелината на роговицата (Таблица 3), непрозрачността (Таблица 4), и задържането на флуоресцеин (Таблица 5) с помощта на четири ИПО-класа се извършва съгласно следните скали:

Таблица 3

Критерии за ИПО класифициране за дебелина 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

(*) Баловите оценки за подуване на роговицата са приложими само ако дебелината се измерва с микроскоп с шпалт-лампа Haag-Streit BP900 с дълбокомер № I и настройка за шпалт-широчината 9½, което се равнява 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 4

Критерии за ИПО класифициране за непрозрачност

Средна максимална 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

(*) Вж. Таблица 1.

▼**M2**

Таблица 5

Критерии за ИПО класифициране за средно задържане на флуоресцеин

Средна балова оценка за задържане на флуоресцеин след 30 минути последващо третиране (*)	ИПО клас
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Вж. Таблица 2.

46. Общата *in vitro* класификация за дразнещо действие на дадено изпитвано вещество се оценява като се отчита класификацията за дразнещо действие, която съответства на комбинацията от категории, получени за подуване на роговицата, непрозрачност на роговицата и задържане на флуоресцеин и като се прилага схемата, представена на Таблица 6.

Таблица 6

Обща *in vitro* класификация за дразнещо действие

Класификация	Комбинация от 3 крайни резултата
Вещество с корозивно/силно дразнещо действие	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 епителия (в най-малко 1 око)

(*) Комбинации, за които има по-слаба вероятност да се получат.

47. Както бе споменато в точка 1, когато изпитваното вещество не се определи като вещество с корозивно или силно дразнещо действие върху очите, следва да бъдат проведени допълнителни изпитвания за целите на класифицирането и етикетирането. Методът за изпитване с ИПО е с обща точност от 83 % (120/144) до 87 % (134/154), неверни положителни резултати 6 % (7/122) до 8 % (9/116), и неверни отрицателни резултати 41 % (13/32) до 50 % (15/30) за определяне на вещества с корозивно или силно дразнещо действие върху очите, в сравнение с данните от *in vivo* метода за изпитване със заешки очи, класифицирани по системите за класифициране на EPA (1), ЕС (2), или GHS (3). Когато от базата данни бъдат изключени вещества от определени химични (напр. алкохоли и повърхностно активни вещества) и физични (напр. твърди вещества) класове, точността на метода ИПО в системите за класифициране на ЕС, EPA, и GHS варира от 91 % (75/82) до 92 % (69/75), неверните положителни резултати варират от 5 % (4/73) до 6 % (4/70), а неверните отрицателни резултати - от 29 % (2/7) до 33 % (3/9) (4).

48. Дори когато дадено изпитвано вещество не получи класификация като вещество с корозивно или силно дразнещо действие върху очите, данните от анализа за ИПО могат да бъдат от полза съвместно с данните от *in vivo* изпитанията със заешки очи или от съответно валидирани *in vitro* изпитания за по-нататъшната оценка на ползата и ограниченията на метода за изследване ИПО за определяне на вещества без силно дразнещо действие и без дразнещо действие (в процес на разработване е Ръководство за използването на *in vitro* метод за изпитване за токсично действие върху очите).

▼M2

Критерии за приемане на изпитанието

49. Едно изпитание се смята за приемливо когато паралелната отрицателна или контрола „разтворител/носител“ и паралелната положителна контрола дават класификация за дразнещо действие, която попада съответно в границите на класовете вещества без силно дразнещо действие и вещества със силно дразнещо/корозивно действие.

Доклад от теста

50. Докладът за теста следва да включва следната информация когато тя се отнася за провеждането на изпитанието:

Изпитвани и контролни вещества

Наименование(-я) на химикала, като например структурното наименование, използвано от Службата CAS, следвано от други наименования, ако са известни;

Регистрационен номер CAS (RN), ако е известен;

Чистота и състав на веществото или сместа (в тегловни проценти), доколкото се разполага с такава информация;

Физикохимични свойства, като например физично състояние, летливост, киселинност, устойчивост, химичен клас, водоразтворимост, отнасяща се до проведеното изследване;

Обработка на изпитваните/контролни вещества преди изпитанието, ако се прилага (напр. затопляне, смилане);

Устойчивост, ако е известна.

Информация за финансиращия и за изпитателната лаборатория

Име и адрес на финансиращия, на изпитателната лаборатория и на ръководителя на изследването;

Идентификация на източника на очите (напр. кланицата, от която са събрани);

Условия на съхранение и транспорт на очите (напр. дата и час на събиране, период от време преди започване на изпитанието);

Ако са налични, специфичните характеристики на животните, от които са събирани очите (напр. възраст, пол, тегло на животното - донор).

Аргументация на използваните методи за изпитване и протокол

Цялостност на метода за изпитване

Процедурата, използвана за осигуряване на цялостност (напр. точност и надеждност) на метода за изпитване във времето (напр. периодично изпитване на опитни вещества, използване на отрицателни и положителни контролни данни от предишни изпитания).

Критерии за приемане на изпитанието

Ако са приложими, приемливи съответни сравнителни контролни диапазони, основани на данни от предишни изпитания.

Тестови условия

Описание на използваната тестова система;

Модел на използвания микроскоп с шпалт-лампа (напр. модел);

Инструментални настройки на използвания микроскоп с шпалт-лампа

Информация за използваните птичи очи, включително декларация за качеството им;

▼**M2**

Подробни данни за използваната процедура за изпитване;

Използвани концентрации на изпитваното вещество;

Описание на евентуални модификации на процедурата за изпитване;

Позоваване на данни от предишни изпитания на модела (напр. отрицателни и положителни контроли, опитни вещества, сравнителни контролни вещества);

Описание на използваните критерии за оценка.

Резултати

Описание на други наблюдавани ефекти;

Ако са приложими, снимки на окото.

Коментар на резултатите.

Заключение.

ЛИТЕРАТУРА

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(2) 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/ЕС и за изменение на Регламент (ЕО) № 1907/2006. ОВ L 353, 31.12.2008 г., стр. 1.

(3) United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. На разположение на адрес:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. На разположение на адрес:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(5) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. На разположение на адрес:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(6) 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.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. На разположение на адрес:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

▼**M2**

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. На разположение на адрес:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. 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) INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). На разположение на адрес:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

(15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. На разположение на адрес:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].

(16) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼**M2**

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. На разположение на адрес:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(19) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe IrritantsIsolated Chicken Eye (ICE) Test Method. На разположение на адрес:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

Допълнение 1

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Точност: Близостта до съответствие между резултатите от метода за изпитване и приетите еталонни стойности. Тя е мярка за функционалните характеристики на метода за изпитване и един аспект на „приложимостта“. Често терминът се използва взаимозаменяемо със „съгласуваност“ и означава делът на правилните резултати от даден метод за изпитване.

Сравнително контролно вещество: Вещество, използвано като норма за сравнение с изпитваното вещество. Едно сравнително контролно вещество следва да притежава следните свойства; (i) постоянен и надежден източник(-ци); (ii) структурно и функционално сходство с класа на изпитваните вещества; (iii) известни физични/химични характеристики; (iv) потвърждаващи данни за известни въздействия, и (v) известна ефективност за постигане на желаната реакция

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 експониране на въздействието на изпитваното вещество. Повишената непрозрачност на роговицата е показател за увреждане на роговицата.

Подуване на роговицата: Обективно измерване при изпитването ИПО за степента на разширение на роговицата след експониране на въздействието на изпитваното вещество. 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 експониране на изпитвания материал в изпитване с ИПО. Степента на подуване е показател за увреждането на роговицата.

Категория 1 на EPA: Корозивно въздействие (необратимо разрушаване на очната тъкан) или въздействие на роговицата или дразнене, траещи повече от 21 дни (1).

Категория R41 на ЕС: Получаване на тъканно увреждане на окото или сериозно физическо влошаване на зрението след прилагане на изпитваното вещество по предната повърхност на окото, което не е напълно обратимо в рамките на 21 дни след прилагането (2).

Дял на неверните отрицателни резултати: Пропорцията на всички невярно определени отрицателни резултати по даден метод за изпитване относно вещества, предизвикващи положителен резултат. Това е един показател за функционалните характеристики на метода за изпитване.

Дял на неверните положителни резултати: Пропорцията на всички невярно определени положителни резултати по даден метод за изпитване относно вещества, предизвикващи отрицателен резултат. Това е един показател за функционалните характеристики на метода за изпитване.

Задържане на флуоресцеин: Субективно измерване при изпитването ИПО за степента на задържане на флуоресцеинов натрий от епителните клетки на роговицата след експониране на изпитваното вещество. Степента на задържане на флуоресцеин е показател за увреждането на епителия на роговицата.

GHS (Глобална хармонизирана система за класифициране и етикетиране на химикали): 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, съобщения за опасност, съобщения за предпазни мерки 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 (3).

▼M2

Категория 1 по GHS: Получаване на тъканно увреждане на окото или сериозно физическо влошаване на зрението след прилагане на изпитваното вещество по предната повърхност на окото, което не е напълно обратимо в рамките на 21 дни след прилагането (3).

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.

Отрицателна контрола: Нетретирано точно копие, съдържащо всички компоненти на дадена тестова система. Тази проба се провежда паралелно с проби, третирани с изпитваното вещество, и с други контролни проби, за определяне доколко разтворителят взаимодейства с тестовата система.

Вещество без дразнещо действие: Веществата, които не се класифицират като вещества с дразнещо действие върху очите от Категории I, II, или III на EPA; Категории R41 или R36 на ЕС; или Категории 1, 2A, или 2B на GHS (1)(2)(3).

Вещество с корозивно действие върху очите: (а) Вещество, което причинява необратимо тъканно увреждане на окото; (б) Вещества, които се класифицират като вещества с дразнещо действие върху очите от Категория 1 на GHS, Категория I на EPA, или Категория R41 на ЕС (1)(2)(3).

Вещество с дразнещо действие върху очите: (а) Вещество, което причинява обратимо изменение на окото след прилагане върху предната повърхност на окото; (б) Вещества, които се класифицират като вещества с дразнещо действие върху очите от Категория II или III на EPA, Категория R36 на ЕС, или Категория 2A или 2B на GHS (1)(2)(3).

Вещество със силно дразнещо действие върху очите: (а) Вещество, което причинява 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) Вещества, които се класифицират като вещества с дразнещо действие върху очите от Категория 1 на GHS, Категория I на EPA, или Категория R41 на ЕС (1)(2)(3).

Положителна контрола: Точно копие, съдържащо всички компоненти на дадена тестова система и третирано с вещество, за което е известно, че индуцира положителна реакция. За да се осигури да може да се направи оценка на измененията във времето на реакцията на положителната контрола, силата на острата реакция не следва да е прекомерно голяма.

Надеждност: Мярка за степента, в която даден метод за изпитване може да бъде провеждан възпроизводимо във времето в рамките на и между различни лаборатории, когато за провеждането му се използва един и същ протокол. Оценката за нея се прави като се изчислява между- и вътрешно-лабораторната възпроизводимост и междулабораторната повторяемост.

Микроскоп с шпалт-лампа: Инструмент, използван за непосредствен оглед на очите под увеличение с биокулярен микроскоп чрез създаване на стереоскопично изправено изображение. При метода 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.

Контрола „разтворител/носител“: Нетретирана проба, съдържаща всички компоненти на дадена тестова система, включително разтворителя или носителя, която е третирана с проби, обработени с изпитваното вещество, и с други контролни проби, за определяне на базовата реакция на обработените проби с изпитваното вещество, разтворено в същия разтворител или носител. Когато се изпитва с паралелна отрицателна контрола тази проба показва също доколко разтворителят или носителят взаимодействат с тестовата система.

▼M2

Поетапно изпитване: Стратегия за стъпаловидно изпитване, при която цялата съществуваща информация за дадено изпитвано вещество се разглежда по конкретен ред, като на всеки етап се оценява значимостта на данните — за определяне доколко съществува достатъчно информация, за да се вземе решение за класифициране на веществото като опасно, преди да се премине към следващия етап. Ако дадено изпитвано вещество може да се определи като вещество с потенциално дразнещо действие въз основа на съществуващата информация, не се налага допълнително изпитване. Ако дадено изпитвано вещество не може да се определи като вещество с потенциално дразнещо действие въз основа на съществуващата информация се провежда процедура за поетапно последователно изпитване върху животни, докато стане възможно да се направи недвусмислена класификация.

Валидиран метод за изпитване: Метод за изпитване, за който са извършени валидиращи изследвания 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 функционални характеристики по отношение на точността и надеждността си, за да се счита за приложим за предлаганата цел.

Оценяване на значимостта на данните: Процесът на отчитане на силните и слаби страни на различни видове информация за достигане до и в подкрепа на дадено заключение относно потенциалната опасност на едно вещество.

▼M2

Допълнение 2

ОПИТНИ ХИМИКАЛИ ЗА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ С ИПО

Преди редовно използване на метод за изпитване, който се основава на настоящия метод за изпитване, лабораториите могат да докажат техническа компетентност като правилно определят класификацията за корозивно действие върху очите за 10-те вещества, препоръчани в Таблица 1. Тези вещества са подбрани като представителни за редица реакции на локално дразнещо/корозивно действие върху окото, въз основа на резултати от *in vivo* изпитване със заешки очи (TG 405) (т.е. Категории 1, 2A, 2B, или Некласифицирано и неетикетирано съгласно глобалната система на ОН GHS)(3)(7). От друга страна, предвид валидираното предназначение на тези анализи (т.е. за определяне само на вещества с корозивно/ силно дразнещо действие върху очите), съществуват само два възможни тестови резултата за целите на класифицирането, с които да се докаже компетентност (вещества с корозивно/силно дразнещо действие или вещества без корозивно/силно дразнещо действие. Други критерии, които бяха използвани за подбор на посочените вещества са: наличието на веществата на пазара, съществуването на висококачествени *in vivo* еталонни данни и съществуването на висококачествени данни от двата метода *in vitro*, за които се разработва Ръководство за изпитване. Поради тази причина веществата с дразнещо действие са подбрани от препоръчителния списък на ICCVAM с 122 еталонни вещества за валидиране на *in vitro* методи за изпитване на токсичност върху очите (вж. Допълнение H: Списък на препоръчителни еталонни вещества на ICCVAM)(4). Еталонните данни са дадени в документацията на ICCVAM за метода за изпитване за непрозрачност и пропускливост на говежда роговица (НПГР) и метода с ИПО (18) (19).

Таблица 1

Препоръчвани вещества за доказване на техническа опитност по отношение на метода ИПО

Химикал	CASRN	Химичен клас ([1])	Физична форма	*In Vivo* Класификация ([2])	*In Vitro* Класификация ([3])
Бензалкониев хлорид (5 %)	8001-54-5	Ониево съединение	Твърдо вещество	Категория 1	Вещество с корозивно/силно дразнещо действие
Хлорхексидин	55-56-1	Амин, амидин	Твърдо вещество	Категория 1	Вещество с корозивно/силно дразнещо действие
Дибензоил-L-винена киселина	2743-38-6	Карбоксилна киселина, естер	Твърдо вещество	Категория 1	Вещество с корозивно/силно дразнещо действие
Имидазол	288-32-4	Хетероциклен	Твърдо вещество	Категория 1	Вещество с корозивно/силно дразнещо действие
Трихлороацетилова киселина (30 %)	76-03-9	Карбонова киселина	Течност	Категория 1	Вещество с корозивно/силно дразнещо действие
2,6-Дихлоробензоил хлорид	4659-45-4	Киселинен халид	Течност	Категория 2A	Вещество без корозивно/силно дразнещо действие
Етил-2-метил ацетоацетат	609-14-3	Кетон, естер	Течност	Категория 2B	Вещество без корозивно/силно дразнещо действие
Амониев нитрат	6484-52-2	Неорганична сол	Твърдо вещество	Категория 2A	Вещество без корозивно/силно дразнещо действие

▼**M2**

Химикал	CASRN	Химичен клас ([1])	Физична форма	*In Vivo* Класификация ([2])	*In Vitro* Класификация ([3])
Глицерин	56-81-5	Алкохол	Течност	Неетикетиран	Вещество без корозивно/силно дразнещо действие
n-Хексан	110-54-3	Въглеводород (ацикличен)	Течност	Неетикетиран	Вещество без корозивно/силно дразнещо действие

Съкращения: CASRN = Номер по регистъра на справочната служба по химикали

([1]) За всяко изпитвано вещество е определен химичен клас, 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 (ОИСР TG 405) и се използва глобалната система GHS на ОН (3)(7).

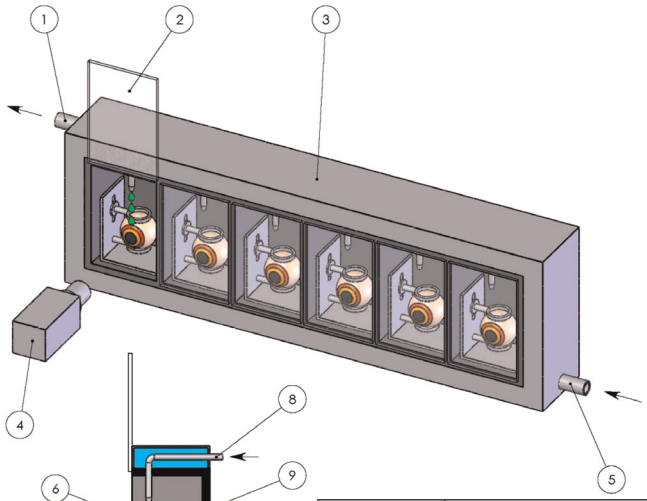
([3]) Базира се на резултати от изпитване за НПГР и ИПО.

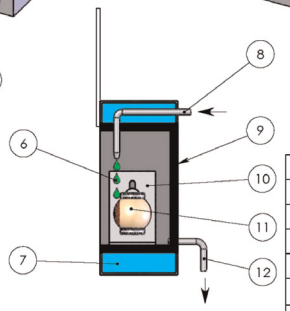
▼**M2**

Допълнение 3

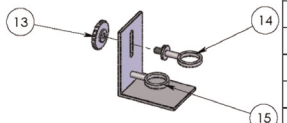
Схеми на обливащ апарат за ИПО и скоби за очи

(Вж. Burton et al. (17) за допълнителни обширни описания на обливащия апарат и скобите за очи)





СЕЧЕНИЕ НА ОТДЕЛЕНИЕТО



ДЪРЖАТЕЛ НА ОКО

ПОЗИЦИЯ №	ОПИСАНИЕ
1	ИЗХОД ТОПЛА ВОДА
2	ПЛЪЗГАЩА СЕ ПРЕГРАДА
3	ОБЛИВАЩ АПАРАТ
4	ОПТИЧЕН ИЗМЕРВАТЕЛЕН ИНСТРУМЕНТ
5	ВХОД ТОПЛА ВОДА
6	СОЛЕН РАЗТВОР
7	ТОПЛА ВОДА
8	ВХОД НА СОЛЕНИЯ РАЗТВОР
9	ОТДЕЛЕНИЕ
10	ДЪРЖАТЕЛ НА ОКО
11	ПИЛЕШКО ОКО
12	ИЗХОД НА СОЛЕНИЯ РАЗТВОР
13	РЕГУЛИРАЩА ГАЙКА
14	РЕГУЛИРУЕМО ГОРНО РАМО
15	ФИКСИРАНО ДОЛНО РАМО

▼M3

Б.49. ИЗПИТВАНЕ *IN VITRO* ЗА МИКРОЯДРА НА КЛЕТКИ ОТ БОЗАЙНИЦИ

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Изпитването *in vitro* за микроядра (MNvit) представлява изпитване за генотоксичност за откриване на микроядра (МЯ) в цитоплазмата на интерфазни клетки. Микроядрата могат да произлизат от ацентрични хромозомни фрагменти (т.е. с липсващ центромер) или от цели хромозоми, които не са в състояние да се придвижат към полюсите по време на анафазния стадий на клетъчно делене. Изпитването открива активността на кластогенните и анеугенните химикали (вещества и смеси) (1) (2) в клетки, които са преминали през клетъчно делене по време на и след експозиция на изпитваното вещество. Настоящият метод за изпитване (МИ) позволява използването на протоколи със и без инхибитор на полимеризацията на актина — цитохалазин Б (цитоБ). Добавянето на цитоБ преди целевата митоза дава възможност за идентификация и селективен анализ на честотата на микроядра в клетките, които са преминали през една митоза, тъй като тези клетки са двуядрени (3) (4). Настоящият МИ позволява използването на протоколи без блокиране на цитокинезата, при условие че са налице доказателства за това, че анализираната популация на клетки е преминала през митоза.

2. В допълнение към използването на изпитването MNvit за идентифициране на химикали (вещества и смеси), които индуцират микроядра, използването на блокиране на цитокинезата, имунохимично маркиране на кинетохорите или хибридизация с центромерни/теломерни проби (флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) също може да предостави информация относно механизмите на увреждане на хромозомите и образуване на микроядра (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Процедурите на маркиране и хибридизация могат да бъдат използвани, когато е налице увеличено образуване на микроядра и изследователят пожелае да определи дали увеличението е резултат от кластогенни и/или анеугенни ефекти.

3. Микроядрата представляват увреждане, което е било предадено на дъщерните клетки, докато хромозомните аберации, отчетени в метафазните клетки, могат да не бъдат предадени. Тъй като микроядрата в интерфазните клетки могат да бъдат оценени относително обективно, лабораторният персонал трябва единствено да определи дали клетките са преминали през делене и колко клетки съдържат микроядро. В резултат на това препаратите могат да бъдат оценени относително бързо, а анализът може да бъде автоматизиран. Поради това е практично да се оценят хиляди вместо стотици клетки в рамките на едно третиране, с което се увеличава статистическата достоверност на изпитването. Накрая, тъй като микроядрата могат да се породят от изоставащи хромозоми, налице е потенциал за откриване на агенти, индуциращи анеуплоидия, които се изследват трудно в рамките на конвенционални изпитвания за хромозомни аберации, напр. Указание за изпитване 473 на ОИСР (глава Б.10 от настоящото приложение) (17). При все това изпитването MNvit не дава възможност за разграничаване на химикалите, индуциращи полиплоидия, от химикалите, индуциращи кластогенност, без специални техники, каквато е техниката FISH, описана в точка 2.

4. Изпитването MNvit представлява метод *in vitro*, при който обичайно се използват култивирани човешки клетки или клетки на гризачи. Той осигурява изчерпателна основа за изследване на възможността за увреждане на хромозомите *in vitro*, тъй като могат да бъдат открити както анеугени, така и кластогени.

5. Изпитването MNvit е устойчиво и ефективно при разнообразни типове клетки и при наличието или липсата на цитоБ. Налице са изчерпателни данни в подкрепа на валидността на изпитването MNvit, за което се използват клетъчни линии на гризачи (CHO, V79, CHL/IU и L5178Y) и човешки лимфоцити (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Те включват по-конкретно данни от международните изпитвания за валидиране, координирани от Société Française de

▼M3

Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) и от докладите от Международния семинар относно изпитването за генотоксичност (4) (16). 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 (НКК) на ECVAM (32) (33) (34). Беше описано използването на човешката лимфобластоидна клетъчна линия TK6 (35), клетките HepG2 (36) (37) и първичната култура на клетки от ембрион на сирийски хамстер (38), въпреки че те не са били използвани в изследвания за валидиране.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

6. Използваните определения са дадени в допълнение 1.

ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ

7. Изпитванията, провеждани *in vitro*, по принцип изискват използването на екзогенен източник на метаболитно активиране, освен когато клетките са с адекватен метаболизиращ капацитет по отношение на изпитваните вещества. Екзогенната система на метаболитно активиране не възпроизвежда изцяло *in vivo* условия. Също така следва внимателно да се избягват условия, които биха довели до изкуствено предизвикани положителни резултати, които не отразяват присъща мутагенност и които биха могли да се породят от фактори като подчертани промени на pH или осмотичното налягане или от високи нива на цитотоксичност (39) (40) (41). Ако изпитваният химикал причини промяна в pH на средата към момента на добавянето, pH следва да бъде коригирано, за предпочитане чрез буфериране на изходния разтвор по такъв начин, че общият обем във всички изпитвани концентрации и за всички контроли да остане същият.

8. За целите на анализиране на индуцирането на микроядра от съществено значение е митозата да е настъпила както при третирани, така и при нетретирани култури. Най-информативният стадий за отчитане на наличието на микроядра е в клетки, които са завършили една митоза по време на или след третиране с изпитваното вещество.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

9. Клетъчните култури с произход от хора или бозайници се подлагат на въздействието на изпитваното вещество със и без екзогенен източник на метаболитно активиране, освен когато се използват клетки с адекватен метаболизиращ капацитет. Във всички изпитвания се включват паралелни контроли с разтворителя/носителя (КН) и положителни контролни химикали (ПК).

10. По време на и след експозицията на изпитваното вещество клетките се отглеждат за период, който е достатъчен, за да позволи увреждането на хромозомите или делителното вретено да доведе до образуването на микроядра в интерфазните клетки. За индуциране на анеуплоидия изпитваното вещество обикновено следва да бъде налично по време на митозата. Събраните и оцветените интерфазни клетки се анализират за наличието на микроядра. В идеалния случай микроядрата следва да бъдат отчетени само в онези клетки, които са преминали през митоза по време на експозиция на изпитваното вещество или по време на периода след експозиция, ако се използва такъв. При култури, които са били третирани с блокер на цитокинезата, това се постига с отчитане само на двуядрените клетки. При липсата на блокер на цитокинезата е важно да се докаже, че е вероятно анализираните клетки да са преминали през клетъчно делене по време на или след експозиция на изпитваното вещество. За всички протоколи е важно да се докаже, че пролиферацията на клетки е настъпила както в контролните, така и в третираните култури, и степента на цитотоксичност или цитостаза, индуцирана от изпитваното вещество, следва да бъде оценена в културите (или в паралелните култури), които се оценяват за наличието на микроядра.

▼M3

ОПИСАНИЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

Препарати

11. Могат да бъдат използвани култивирани първични човешки лимфоцити от периферна кръв (5) (19) (42) (43) и редица клетъчни линии на гризачи, например клетките CHO, V79, CHL/IU и L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Използването на други клетъчни линии и типове следва да бъде обосновано въз основа на тяхната доказана ефективност в рамките на изпитването, както е описано в раздела „Критерии за приемливост“. Тъй като фоновата честота на микроядрата ще окаже влияние върху чувствителността на изпитването, препоръчва се използването на типове клетки с ниска, стабилна фонова честота на образуване на микроядра.

12. Човешките лимфоцити от периферна кръв следва да бъдат получени от млади (на приблизителна възраст 18—35 години), здрави индивиди, които не са пушачи и за които не е известно скорошно излагане на генотоксични химикали или радиация. Броят на донорите следва да бъде посочен, ако се обединят клетките от повече от един донор в обща група за използване. Честотата на микроядрата нараства с възрастта и тази тенденция е по-изразена при индивидите от женски пол, отколкото при индивидите от мъжки пол (44), като това следва да бъде взето предвид при подбора на донорни клетки за обединяване в обща група.

Среди и условия за отглеждане на културата

13. При отглеждането на културата следва да се използват подходяща хранителна среда и инкубационни условия (съдове за културата, концентрация на CO_2, температура и влажност). Установените клетъчни линии и щамове следва да се проверяват рутинно за стабилност на модалния брой на хромозомите и отсъствие на микоплазмено замърсяване и не следва да се използват, ако са замърсени или има промени в модалния брой на хромозомите. Следва да се знае нормалното време на клетъчен цикъл при използваните условия за отглеждане на културата в лабораторията, провеждаща изпитването. Ако се използва методът на блокиране на цитокинезата, тогава концентрацията на инхибитора на цитокинезата следва да бъде оптимизирана за конкретния тип клетки и следва да се докаже, че тя произвежда добра реколта от двуядрени клетки за отчитане.

Приготвяне на културите

14. Установени клетъчни линии и щамове: размножават се клетки от изходни култури, посяват се в хранителна среда с такава гъстота, че културите да не достигат точката на сливане в монослоеве и суспензионните култури да не достигнат прекомерна гъстота преди времето на събиране, и се инкубират при 37 °C.

15. Лимфоцити: цялостна кръв, третирана с антикоагулант (напр. хепарин), или изолирани лимфоцити се култивират в присъствието на митоген, напр. фитохемаглутинин (ФХА), преди експозиция на изпитваното вещество и на цитоБ.

Метаболитно активиране

16. Следва да се използват екзогенни метаболизиращи системи при използването на клетки с недостатъчен ендогенен метаболичен капацитет. Най-често използваната система е постмитохондрична фракция (S9) с добавка на ко-фактор, приготвена от черните дробове на гризачи, третирани с ензимно индуциращи агенти като Ароклор 1254 (45) (46) или смес от фенобарбитон и β-нафтофлавон (46) (47) (48) (49). Последната комбинация не противоречи на Стокхолмската конвенция за устойчивите органични замърсители (50) и Регламент (ЕО) № 850/2004 относно устойчивите органични замърсители (66) и е доказано, че е също толкова ефективна, колкото Ароклор 1254 за индуцирането на оксидазите със смесени функции (46) (47) (48) (49). Фракцията S9 обикновено се използва в концентрации, вариращи от 1 до 10 % (об./об.) в последната среда на изпитване. Състоянието на системата за метаболитно активиране може да зависи от класа на изпитвания химикал и в някои случаи може да е подходящо да се използва повече от една концентрация на S9.

▼M3

17. Създадените чрез генно инженерство клетъчни линии, експресиращи специфични човешки активиращи ензими или активиращи ензими на гризачи, могат да премахнат необходимостта от екзогенна система за метаболитно активиране и могат да се използват като тестклетки. В такива случаи изборът на използваните клетъчни линии следва да е научно обоснован, например чрез приложимостта на оксидази със смесени функции за метаболизма на изпитваното вещество (51) и реагирането им на известни кластогени и анеугени (вж. отделния раздел „Критерии за приемливост“). Следва да се отбележи, че изпитваното вещество може да не бъде метаболизирано от оксидазата(ите) с изразени смесени функции; в такъв случай отрицателните резултати няма да покажат, че изпитваното вещество не може да индуцира микроядра.

Приготвяне на изпитваното вещество

18. Твърдите химикали следва да се разтворят в подходящи разтворители или носители и ако е необходимо, да се разредят преди третиране на клетките. Течните химикали могат да се добавят директно в системите за изпитване и/или да се разредят преди третирането. Газовете или летливите химикали следва да бъдат изпитвани чрез подходящи изменения на стандартните протоколи, като например обработване в запечатани съдове (52) (53). Следва да се използват пресни препарати на изпитваното вещество, освен ако данните за устойчивостта му показват, че то може да се съхранява.

Условия на изпитване

Разтворители/носители

19. Разтворителят/носителят не следва да реагира с изпитваното вещество или да е несъвместим с оцеляването на клетките или с поддържането на активността на S9 при използваната концентрация. Ако се използват различни от добре утвърдените разтворители/носители, (напр. вода, среда за клетъчни култури, диметил сулфоксид), използването им следва да бъде подкрепено от данни за съвместимостта им с изпитваното вещество и липсата им на генетична токсичност. Препоръчва се винаги когато е възможно първо да се обмисля възможността за използването на воден разтворител/носител.

Използване на цитоБ като блокер на цитокинезата

20. Едно от най-важните съображения при извършването на изпитването MNvit е да се осигури, че оценяваните клетки са преминали през митоза по време на третирането или инкубационния период след третирането, ако се използва такъв. ЦитоБ е агентът, който е бил най-широко използван за блокиране на цитокинезата, тъй като той инхибира събирането на актин и по този начин предотвратява отделянето на дъщерни клетки след митоза, което води до образуването на двуядрени клетки (5) (54) (55). Поради това отчитането на микроядра може да се ограничи до клетки, които са преминали през митоза по време на или след третиране. Въздействието, което изпитваното вещество оказва върху кинетиката на клетъчната пролиферация, може да бъде измерено едновременно. ЦитоБ следва да бъде използван като блокер на цитокинезата, когато се използват човешки лимфоцити, тъй като периодите на клетъчен цикъл ще варират при различните култури и донори и тъй като не всички лимфоцити ще реагират на ФХА (фитохемаглутинин). При изпитване на клетъчните линии са били използвани други методи, за да се прецени дали оценяваните клетки са претърпели делене; тези методи са разгледани по-долу (вж. точка 26).

21. Лабораторията следва да определи подходящата концентрация на цитоБ за всеки тип клетки за постигане на оптималната честота на двуядрени клетки в контролните култури, третирани с разтворителя/носителя. Подходящата концентрация на цитоБ обикновено е между 3 и 6 μg/ml.

▼M3

Измерване на пролиферацията на клетки и цитотоксичността и избиране на концентрации на експозиция

22. При определяне на най-високата концентрация на изпитваното вещество, която да бъде изпитана, следва да се избягват концентрациите, които могат да доведат до изкуствено предизвикани положителни реакции, например които предизвикват прекомерна цитотоксичност, преципитиране в хранителната среда и явни промени в pH или осмотичното налягане (39) (40) (41).

23. Извършват се измервания на пролиферацията на клетките, за да се гарантира, че третираните клетки са преминали през митоза по време на изпитването, както и че третиранията са извършени при подходящи нива на цитотоксичност (вж. точка 29). Цитотоксичността следва да се определи със и без метаболитно активиране в клетки, които изискват метаболитно активиране, като се използва относителният ръст в количеството клетки (RICC) или относителното удвояване на популации (RPD) (вж. допълнение 2 за формули), освен когато се употребява цитоБ. Когато се употребява цитоБ, цитотоксичността може да бъде определена, като се използва индексът на репликация (RI) (вж. допълнение 2 за формула).

24. 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 (5) и гарантира, че се отчитат само клетки, които са преминали през делене по време на или след третирането.

25. При изследвания с цитоБ, цитостазата/цитотоксичността може да бъде определена количествено чрез индекса на пролиферация при блокиране на цитокинезата (CBPI) (5) (26) (56) или да бъде получена чрез RI от поне 500 клетки на култура (вж. допълнение 2 за формули). Когато се използва цитоБ за оценка на пролиферацията на клетки, CBPI или RI следва да бъдат определени от поне 500 клетки на култура. Тези измервания, наред с другите измервания, могат да бъдат използвани за оценяване на цитотоксичността чрез сравняване на стойностите в третираните и контролните култури. Оценката на другите маркери за цитотоксичност (напр. сливане, клетъчен брой, апоптоза, некроза, прекъсване на метафази) може да предостави полезна информация.

26. При изследвания без цитоБ е необходимо да се докаже, че клетките, отчетени в културата, са преминали през делене по време на или след третирането с изпитваното вещество, в противен случай могат да се получат погрешно отрицателни реакции. Методите, които са използвани, за да се гарантира, че преминалите през делене клетки, които се отчитат, включват инкорпориране и последващо откриване на бромодеоксиуридин (BrdU) за идентифициране на клетки, които са се репликирали (57), образуването на клонинги, когато клетките от постоянни клетъчни линии се третират и отчитат *in situ* върху микроскопско предметно стъкло (индекс на пролиферация (PI)) (25) (26) (27) (28), или измерването на относително удвояване на популации (RPD), относителен ръст в количеството клетки (RICC) или други доказани методи (16) (56) (58) (59) (вж. допълнение 2 за формули). Оценката на другите маркери за цитотоксичност или цитостаза (напр. сливане, клетъчен брой, апоптоза, некроза, прекъсване на метафази) може да предостави полезна информация.

27. Следва да се оценят най-малко три концентрации, които могат да бъдат подложени на анализ. За да се постигне това, може да бъде необходимо да се извърши опит, като се използва голям брой близки по стойност концентрации и да се анализира образуването на микроядра в тези концентрации, като се предостави подходящият диапазон от цитотоксичности. Алтернативна стратегия е да се извърши предварителен тест за цитотоксичност с цел стесняване на диапазона за окончателното изпитване.

28. Най-високата концентрация следва да има за цел постигане на цитотоксичност в размер на 55 ± 5 %. По-високите равнища могат да индуцират увреждане на хромозомите като вторичен ефект от цитотоксичността (60). Когато се прояви цитотоксичност, избраните изпитвани концентрации следва да обхващат диапазон от цитотоксичност в размер на 55 ± 5 % до малка или нулева токсичност.

▼M3

29. Ако не се наблюдава никаква цитотоксичност или преципитат, най-високата изпитвана концентрация следва да съответства на 0,01 M, 5 mg/mL или 5 µl/mL, в зависимост коя от стойностите е най-ниска. В общия случай концентрациите, избрани за анализ, следва да бъдат разграничени една от друга със стойност, непревишаваща 10. За изпитвани вещества, които показват стръмна крива „концентрация — отговор“, може да бъде необходимо сближаване на концентрациите на изпитваните вещества по стойност, така че културите в диапазоните на средна и ниска токсичност също да бъдат оценени.

30. Когато разтворимостта е ограничаващ фактор, максималната концентрация, ако не е ограничена от цитотоксичност, следва да бъде най-ниската концентрация, при която минималният преципитат е видим при култури, при условие че липсва каквото и да било въздействие върху оценяването. Оценяването на преципитацията следва да бъде извършвано чрез методи като оптическа микроскопия, като се отбелязва преципитатът, който се задържа или се появява по време на култивирането (към края на третирането).

Контроли

31. Във всеки опит следва да бъдат включени паралелни положителни контроли и контроли с разтворителя/носителя, както със, така и без метаболитно активиране.

32. ПК са необходими за показване на способността на използваните клетки и протокола от изпитването с цел идентифициране на кластогените и анеугените, както и за потвърждаване на метаболитния капацитет на препарата S9. За извършване на ПК следва да се използват известни индуктори на образуване на микроядра при концентрации, които се очаква да породят малки, но възпроизводими увеличения над фоновите равнища, както и да се демонстрира чувствителността на системата за изпитване. Концентрациите на положителната контрола следва да са избрани така, че ефектите да са ясни, но да не разкриват непосредствено на четящото устройство идентичността на кодираните предметни стъкла.

33. Следва да бъде използван кластоген, който изисква метаболитно активиране (напр. циклофосфамид; бензо[а]пирен), за да се демонстрира както метаболитното активиране, така и способността на системата за изпитване за откриване на кластогени. Ако са обосновани, могат да се използват и други ПК. Тъй като някои ПК, които имат нужда от метаболитно активиране, могат да бъдат активни без екзогенно метаболитно активиране при определени условия на третиране или в определени клетъчни линии, необходимостта от метаболитно активиране, както и активността на препарата S9 следва да бъдат изпитани в избраната клетъчна линия и при избраните концентрации.

34. Понастоящем не са известни анеугени, които изискват метаболитно активиране на тяхната генотоксична активност (16). Възприетите към настоящия момент ПК за анеугенна активност са например колхицин и винбластин. Могат да бъдат използвани и други химикали, ако те индуцират микроядра единствено или основно чрез анеугенна активност. С цел избягване на необходимостта от две ПК (за кластогенност и анеугенност) без метаболитно активиране, контролата на анеугенността може да служи за ПК без S9, а контролата на кластогенността може да бъде използвана за изпитване на адекватността на използваната система за метаболитно активиране. За клетките, които не изискват S9, следва да се използват ПК както за кластогенността, така и за анеугенността. Предложените ПК са включени в допълнение 3.

35. Може да се обмисли използването на положителни контролни химикали, принадлежащи към даден химичен клас, когато са налични подходящи химикали. Всички използвани ПК следва да бъдат подходящи за клетъчния тип и условията на активиране.

▼M3

36. Контролите, третирани с разтворителя/носителя, следва да бъдат включвани за всеки период на събиране. В допълнение към това следва също да се използват нетретирани ОК (които не се третират с разтворителя/носителя), освен когато са налице публикувани или лабораторни контролни данни от предишни изследвания, показващи, че от избрания разтворител при използваната концентрация не се предизвикват генотоксични или други делеционни ефекти.

ПРОЦЕДУРА НА ИЗПИТВАНЕ

График на третиране

37. 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 да бъдат третирани с изпитваното вещество по време на всички стадии на техните клетъчни цикли. 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, и тези въпроси са разгледани в точки 41—43 (16).

38. Теоретичните съображения, заедно с публикуваните данни (18), показват, че повечето анеугени и кластогени ще бъдат открити в рамките на кратък период на третиране от не повече от 3 до 6 часа при наличието и липсата на S9, последван от премахване на изпитваното вещество и период на растеж от 1,5—2,0 клетъчни цикъла (6). Събират се проби от клетките в период, равняващ се на около 1,5—2,0 пъти обичайната (т.е. при липса на третиране) продължителност на клетъчния цикъл или след началото, или в края на третирането (вж. таблица 1). Периодите на вземане на проби или възстановяване могат да бъдат удължени, ако е известно или се допуска, че изпитваното вещество засяга продължителността на клетъчния цикъл (напр. при изпитване на нуклеозидни аналози).

39. Поради потенциалната цитотоксичност на препаратите S9 за култивирани клетки от бозайници, третиране с удължен период на експозиция с продължителност 1,5—2,0 обичайни клетъчни цикъла се прилага само при липсата на S9. При удължения период на третиране се предлагат варианти, които позволяват третиране на клетките с изпитвания химикал при наличието или липсата на цитоБ. Тези варианти са насочени към ситуации, при които е възможно да има опасения, свързани с възможните взаимодействия между изпитваното вещество и цитоБ.

40. Предложените графици на третиране на клетките са представени в таблица 1. Тези общи графици на третиране могат да бъдат изменяни в зависимост от стабилността или реактивността на изпитваното вещество или конкретните характеристики, свързани с растежа на използваните клетки. Всички третирания следва да започват и приключват, докато клетките растат експоненциално. Тези графици са представени по-подробно в точки 41—47 по-долу.

Таблица 1

Третиране на клетки и време за събиране за изпитването MNvit

Лимфоцити, първични клетки и клетъчни линии, третирани с цитоБ	+ S9	Извършва се третиране за 3—6 часа при наличието на S9; премахват се S9 и средата, в която се извършва третирането; добавят се чиста среда и цитоБ; събиране след период с продължителността на 1,5—2,0 нормални клетъчни цикъла.
	– S9 Кратка експозиция	Извършва се третиране за 3—6 часа; премахва се средата, в която се извършва третирането; добавят се чиста среда и цитоБ; събиране след период с продължителността на 1,5—2,0 нормални клетъчни цикъла.

▼**M3**

	– S9 Удължена експозиция	*Вариант А:* извършва се третиране в продължение на 1,5—2 нормални цикъла при наличието на цитоБ; в края на периода на експозиция се събира клетъчната реколта. *Вариант Б:* извършва се третиране в продължение на 1,5—2,0 нормални клетъчни цикъла; премахва се изпитваното вещество; добавят се чиста среда и цитоБ; събиране след период с продължителността на 1,5—2,0 нормални клетъчни цикъла.
Клетъчни линии третирани без цитоБ. (Идентични на графиците на третиране, описани по-горе, с изключение на това, че не се добавя никакъв агент цитоБ.)		

Лимфоцити, първични клетки и клетъчни линии, третирани с цитоБ

41. За лимфоцитите най-ефикасният подход е започване на експозицията на изпитваното вещество 44—48 часа след стимулация с ФХА, когато синхронизацията на циклите ще е изчезнала (5). При първоначалното изпитване клетките се третират за период от 3 до 6 часа с изпитваното вещество при липсата и наличието на S9. Средата, в която се извършва третирането, се премахва и се заменя с чиста среда, която съдържа цитоБ, а клетките се събират след период с продължителността на 1,5—2,0 нормални клетъчни цикъла.

42. Ако и двете първоначални изпитвания на краткосрочното (3—6 часа) третиране са отрицателни или неясни, се използва последващо третиране с удължен период на експозиция без S9. Налични са два варианта на третиране, като и двата са приемливи в еднаква степен. При все това може да е по-уместно да се използва вариант А за стимулирани лимфоцити, когато е вероятно продължителността на експоненциалния растеж да намалее до 96 часа след стимулацията. Освен това клетъчните култури следва да не са достигнали до сливане към момента на окончателното взимане на проби, както е описано във вариант Б.

— Вариант А: клетките се третират с изпитваното вещество за период от време с продължителността на 1,5—2,0 нормални клетъчни цикъла и се събират в края на периода на третиране.

— Вариант Б: клетките се третират с изпитваното вещество за период от време с продължителността на 1,5—2,0 нормални клетъчни цикъла. Средата, в която се извършва третирането, се премахва и се за заменя с чиста среда, а клетките се събират след допълнителен период с продължителността на 1,5—2,0 нормални клетъчни цикъла.

43. Първичните клетки и клетъчните линии следва да бъдат третирани по начин, подобен на начина на третиране на лимфоцитите, с изключение на това, че не е необходимо да бъдат стимулирани с ФХА за период от 44—48 часа. Клетките, различни от лимфоцити, следва да бъдат изложени на въздействие по такъв начин, че към момента на прекратяване на изследването те все още да се намират в логаритмична фаза на растеж.

Клетъчни линии, третирани без цитоБ

44. Клетките следва да бъдат третирани за 3—6 часа при наличие и при липса на S9. Средата, в която се извършва третирането, се премахва и се заменя с чиста среда, а клетките се събират след период с продължителността на 1,5—2,0 нормални клетъчни цикъла.

▼M3

45. Ако и двете първоначални изпитвания на краткосрочното (3—6 часа) третиране са отрицателни или неясни, се използва последващо третиране с удължен период на експозиция (без S9). Налични са два варианта на третиране, като и двата са приемливи в еднаква степен:

— Вариант А: клетките се третират с изпитваното вещество за период от време с продължителността на 1,5—2,0 нормални клетъчни цикъла и се събират в края на периода на третиране.

— Вариант Б: клетките се третират с изпитваното вещество за период от време с продължителността на 1,5—2,0 нормални клетъчни цикъла. Средата, в която се извършва третирането, се премахва и се заменя с чиста среда, а клетките се събират след допълнителен период с продължителността на 1,5—2,0 нормални клетъчни цикъла.

46. 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 изпитваното вещество. Следва да се положат грижи те да бъдат събрани при измиване на културите и да бъдат върнати в културите, за да се избегне загубата на клетки, намиращи се в стадий на митоза, и на такива, за които е налице риск от образуване на микроядра, към момента на събиране на клетъчната реколта.

Брой на културите

47. Следва да се използват дубликатни култури за всяка концентрация на изпитвано вещество и за културите, третирани с носителя/разтворителя и отрицателните контролни култури. Когато чрез лабораторната база данни от предишни изследвания може да се докаже минимално вариране между дубликатните култури, използването на единични култури може да бъде приемлив вариант. Ако се използват единични култури, се препоръчва анализирането на увеличен брой концентрации.

Събиране на клетки и подготовка на предметно стъкло

48. Всяка култура се събира и обработва отделно. Подготовката на клетките може да включва хипотонично третиране, но тази мярка не е необходима, ако по друг начин е постигнато адекватно разстилане на клетките. В подготовката на предметното стъкло могат да бъдат използвани различни техники, при условие че е постигната висококачествена подготовка на клетките за оценяване. Цитоплазмата на клетките следва да бъде запазена, за да се даде възможност за откриването на микроядра и (в метода на блокиране на цитокинезата) надеждното идентифициране на двуядрени клетки.

49. Предметните стъкла могат да бъдат оцветявани чрез използване на различни методи, като Giemsa или флуоресцентни специфични оцветители за ДНК (59). Използването на специфичен оцветител за ДНК (напр. акридин оранжево (61) или Хьохст 33258 плюс пиронин-Y (62) може да елиминира някои от артефактите, свързани с използването на оцветител, който не е специфичен за ДНК. Антикинетохорните антитела, FISH с панцентромерни ДНК проби или праймирано маркиране *in situ* с праймери, специфични за панцентромера, заедно с подходящо контрастно оцветяване на ДНК, могат да бъдат използвани за идентифициране на съдържанието (хромозоми/хромозомни фрагменти) на микроядрата, ако механистичната информация за тяхното образуване представлява интерес (15) (16). Могат да бъдат използвани и други методи за разграничаване на кластогените от анеугените, ако те са се доказали като ефективни.

Анализ

50. Всички предметни стъкла, включително тези на разтворителя/носителя и на контролите, следва да се кодират независимо едно от друго преди микроскопския анализ. Алтернативно, кодираните проби могат да бъдат анализирани чрез използване на валидирана, автоматизирана система за поточна цитометрия или анализ на изображения.

▼**M3**

51. При култури, третирани с цитоБ, честотата на микроядрата следва да бъде анализирана при поне 2 000 двуядрени клетки на концентрация (поне 1 000 двуядрени клетки на култура; две култури на концентрация). Ако се използват единични култури, от тази култура следва да бъдат отчетени поне 2 000 двуядрени клетки на концентрация. Ако за оценяване при всяка концентрация са налични значително по-малко от 1 000 двуядрени клетки на култура или по-малко от 2 000 при единична култура и ако не е открито значително увеличение на микроядрата, изпитването следва да бъде повторено с използване на повече клетки или при по-малко токсични концентрации, което от двете е уместно. Следва да се внимава да не се отчитат двуядрени клетки с неправилни форми или, когато двете ядра се различават в голяма степен по размер, двуядрените клетки не следва да се бъркат със слаборазстлани многоядрени клетки. Клетките, които съдържат повече от две основни ядра, не следва да бъдат анализирани за наличието на микроядра, тъй като базовата честота на микроядрата може да бъде по-висока при тези клетки (63) (64). Отчитането на едноядрените клетки е приемливо, ако е доказано, че изпитваното вещество оказва влияние върху активността на цитоБ.

52. При клетъчни линии, изпитвани без третиране с цитоБ, микроядрата следва да бъдат отчетени при поне 2 000 клетки на концентрация (поне 1 000 клетки на култура; две култури на концентрация). Когато се използва само една култура на концентрация, от тази култура следва да бъдат отчетени поне 2 000 клетки.

53. Когато се употребява цитоБ, CBPI или RI следва да бъдат определени за оценка на пролиферацията на клетките (вж. допълнение 2), като се използват поне 500 клетки на култура. Когато третиранията се извършват при липсата на цитоБ, от съществено значение е да бъдат предоставени доказателства, че оценяваните клетки са пролиферирали, както е обсъдено в точки 24—27.

Критерии за приемливост

54. Лаборатория, която предлага да използва изпитването MNvit, описано в този МИ, следва да докаже своята способност надеждно и точно да открива химикали с известна анеугенна и кластогенна активност, със и без метаболитно активиране, както и известни отрицателни химикали чрез използване на референтните химикали, изброени в допълнение 3. Като доказателство за своята способност да извърши този МИ правилно, лабораторията следва да предостави доказателства, че клетките, които се оценяват за образуване на микроядра, са преминали през едно клетъчно делене, ако изпитването е проведено без използване на цитоБ.

55. Химикалите, изброени в допълнение 3, се препоръчват за използване като референтни химикали. Могат да бъдат включени химикали заместители или допълнителни химикали, ако тяхната активност е известна, ако те индуцират микроядра посредством същите механизми за действие и ако за тях е доказано, че са приложими към химикалите чрез използване на процедурата MNvit. Обосновката може да включва изследване за валидиране, използващо голямо разнообразие от вещества или фокусирано върху по-тесен спектър въз основа на химичния клас на изпитваното вещество или изследвания механизъм на увреждане.

56. Контролните култури, третирани с разтворителя/носителя, и нетретираните култури следва да имат възпроизводимо ниски и съгласувани честоти на микроядра (обикновено 5—25 микроядра/1 000 клетки за клетъчните типове, идентифицирани в точка 11). Другите типове клетки могат да имат различни спектри от реакции, които следва да бъдат определени, когато те се валидират за използване в изпитването MNvit. Данните от отрицателните контроли, контролите на разтворителя и ПК следва да се използват за установяване на диапазоните от контроли от предишни изследвания. Тези стойности следва да се използват при определяне на адекватността на едновременните НК/ПК за даден експеримент.

▼M3

57. Ако за изпитването са предложени незначителни промени на протокола (напр. използване на автоматизирани вместо ръчни техники на оценяване; използване на нов тип клетки), ефективността на промяната следва да бъде показана преди измененият протокол да може да бъде счетен за приемлив за използване. Показването на ефективност включва демонстриране, че могат да се открият основните механизми на разкъсване и придобиване или загуба на хромозоми, както и че могат да бъдат постигнати подходящи положителни и отрицателни резултати за класа на отделните вещества или широкия спектър от вещества, които ще бъдат изпитвани.

ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

Обработка на резултатите

58. Ако се използва техниката на блокиране на цитокинезата, в оценката на индуцирането на микроядра се използват само честотите на двуядрените клетки с микроядра (независимо от броя на микроядрата в една клетка). Отчитането на броя на клетките с едно, две или повече ядра може да предостави полезна информация, но не е задължително.

59. Следва да се определят съпътстващите измервания на цитотоксичността и/или цитостазата за всички третирани и контролни култури, третирани с разтворителя/носителя (58). Следва да бъдат изчислени CBPI или RI за всички третирани и контролни култури като измервания на забавяне на клетъчния цикъл, когато се използва методът на блокиране на цитокинезата. При липса на цитоБ следва да бъдат използвани RPD, RICC или PI (вж. допълнение 2).

60. Следва да се предоставят данни за отделните култури. В допълнение към това всички данни следва да бъдат обобщени в табличен вид.

61. Химикалите, които индуцират микроядра в изпитването Mnvit, постигат това, като индуцират разкъсване на хромозоми, загуба на хромозоми или комбинация от двете. Последващият анализ, при който се използват антикинетохорни антитела, специфични за центромера проби *in situ* или други методи, може да бъде използван за определяне дали механизмът за индуциране на микроядра се дължи на кластогенна и/или анеугенна активност.

Оценка и тълкуване на резултатите

62. Няма изискване за потвърждаване на ясна положителна или отрицателна реакция чрез допълнително изпитване. Двузначните резултати могат да бъдат изяснени чрез анализ на още 1 000 клетки от всички култури с цел избягване на маскиране. Ако резултатът не бъде изяснен при този подход, следва да бъде извършено допълнително изпитване. Изменението на параметрите на изследването с цел разширяване или стесняване на обхвата на условията, ако е целесъобразно, следва да се вземе предвид при последващите експерименти. Параметрите на изследването, които могат да се изменят, включват границите на изпитваната концентрация, подбиране на подходящия момент на третиране и събирането на клетки и/или условията на метаболитно активиране.

63. Има няколко критерия за определяне на положителен резултат, като например свързано с концентрацията увеличение, или статистически значимо увеличение в броя на клетките, съдържащи микроядра. Първо следва да се разгледа биологичната значимост на резултатите. Проучването дали наблюдаваните стойности са в рамките на или извън границите на историческата контрола може да осигури насоки при оценката на биологичната значимост на реакцията. Може да бъдат използвани подходящи статистически методи като помощно средство за оценка на резултатите от изпитването (65). Резултатите от статистическото изпитване обаче следва да се оценяват във връзка със зависимостта доза—отговор. Възпроизводимостта и данните от предишни изпитвания също следва да бъдат взети предвид.

▼M3

64. Въпреки че повечето опити дават ясни положителни или отрицателни резултати, в някои случаи наборът от данни изключва категоричната преценка за активността на изпитваното вещество. Тези неясни или съмнителни реакции могат да продължат да се получават, независимо колко пъти е повторен опитът.

65. Положителните резултати от изпитването MNvit показват, че изпитваното вещество индуцира разкъсване на хромозоми или загуба на хромозоми в култивирани клетки от бозайници. Отрицателните резултати показват, че при използваните условия на изпитване изпитваното вещество не индуцира разкъсване на хромозоми и/или придобиване или загуба на хромозоми в култивирани клетки от бозайници.

Протокол от изпитването

66. Протоколът от изпитването следва да включва поне следната информация, когато тя има отношение към провеждането на изпитването:

Изпитван химикал:

— идентификационни данни и номер съгласно химичния регистър на Службата за химични индекси (CAS номер) и ЕС номер;

— физическа природа и чистота;

— физикохимични свойства, които имат отношение към провеждането на изпитването;

— реактивоспособност на изпитвания химикал с разтворителя/носителя или средата за клетъчните култури.

Разтворител/носител:

— обосновка за избора на разтворител/носител;

— разтворимост и устойчивост на изпитваното вещество в разтворителя/носителя.

Клетки:

— тип и източник на използваните клетки;

— дали използваният тип клетки е подходящ;

— отсъствие на микоплазма, ако е приложимо;

— информация за продължителността на клетъчния цикъл, времето за удвояване или индекса на пролиферация;

— когато се използват лимфоцити, пол, възраст и брой на кръвните донори, ако е приложимо;

— когато се използват лимфоцити, дали на експозиция са изложени цялостната кръв или изолирани лимфоцити;

— брой на пасажи, ако е приложимо;

— методи за поддържане на клетъчните култури, ако е приложимо;

— модален брой на хромозомите;

— нормално (отрицателна контрола) време на клетъчен цикъл.

Условия на изпитване:

— идентичност на блокера на цитокинезата (напр. цитоБ), ако се използва такъв, неговата концентрация и времетраене на експозицията на клетките;

— обосновка за избора на концентрации и броя на култури, включително данни за цитотоксичността и граници на разтворимост, ако са налични;

— състав на средите, концентрация на CO_2, ако е приложимо;

— концентрации на изпитваното вещество;

▼M3

— концентрация (и/или обем) на носителя и добавеното изпитвано вещество;

— 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, включително критерии за приемливост;

— положителни контролни химикали и отрицателни контроли;

— методи на подготовка на предметното стъкло и използвана техника на оцветяване;

— критерии за идентификация на микроядрата;

— брой на анализираните клетки;

— методи за измерване на цитотоксичността;

— всякаква допълнителна информация, свързана с цитотоксичността;

— критерии за считане на изследванията за положителни, отрицателни или неясни;

— използван(и) метод(и) за статистически анализ;

— методи като използването на кинетохорно антитяло за определяне дали микроядрата съдържат цели хромозоми или хромозомни фрагменти, ако е приложимо.

Резултати:

— използвано измерване на цитотоксичността, напр. CBPI или RI в случай че се използва метод на блокиране на цитокинезата; RICC, RPD или PI, когато не се използват методи на блокиране на цитокинезата; други приложими наблюдения, напр. клетъчно сливане, апоптоза, некроза, преброяване на метафази, честота на двуядрените клетки;

— признаци на преципитация;

— данни за pH и осмотичното налягане на средата на третиране, ако са определени;

— определяне на приемливи клетки за анализ;

— разпределянето на едноядрените, двуядрените 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 двуядрени или едноядрени клетки;

— зависимостта концентрация—отговор, където е възможно;

— данни за паралелни отрицателни контроли (с разтворителя/носителя) и положителни контролни химикали (концентрации и разтворители);

— данни от предишни изпитвания за паралелни отрицателни контроли (с разтворителя/носителя) и положителни контролни химикали, с интервали, средни стойности, стандартно отклонение и доверителен интервал (напр. 95 %);

— статистически анализ; p-стойности, ако има такива.

Обсъждане на резултатите

Заключения

▼M3

ЛИТЕРАТУРА

(1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1-4.

(2) Parry, J.M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3-15.

(3) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233-246.

(4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen*., 35, 167-172.

(5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols, 2* (5), 1084-1104.

(6) Fenech, M. and Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193-198.

(7) Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.

(8) Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9-20.

(9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297-302.

(10) Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 8, 329-334.

(11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205-213.

(12) Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519-525.

(13) Eastmond, D.A, Rupa, D.S. and Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9-20.

(14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. and Bentley, K.S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233-245.

(15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211-219.

(16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153-163.

▼M3

(17) OECD (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Test Guideline № 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. На разположение на адрес: [[www.oecd.org/env/testguidelines]

(18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 13-36.

(19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37-60.

(20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 61-87.

(21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88-124.

(22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125-152.

(23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187-208.

(24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45-59.

(25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.*, 410, 81-116.

(26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183-190.

(27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55-71.

(28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res*., 468, 137-163.

(29) Garriott, M.L., Phelps, J.B. and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 517, 123-134.

(30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 14, 569-580.

▼**M3**

(31) Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 1-152.

(32) ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 ноември 2006 г., На разположение на адрес: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(33) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel, На разположение на адрес: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 23, 271-283.

(35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105-115.

(36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 17, 257-260.

(37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315-328.

(38) Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61-70.

(39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147-205.

(40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297-305.

(41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen*., 8, 789-886.

(42) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29-36.

(43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11-18.

(44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* **37**, 31-45.

▼**M3**

(45) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.

(46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. and Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.

(47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.

(48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, *In:* de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, стр. 85-88.

(49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. and Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51-59.

(50) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). На разположение на адрес: [http://www.pops.int/]

(51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247-274.

(52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In:* Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, стр. 91-103.

(53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795-801.

(54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35-44.

(55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103-112.

(56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group“, *Mutation Res.*, 564, 97-100.

(57) Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61-65.

(58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1-3.

(59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169-184.

(60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, Environ. Molec. *Mutagenesis* 35, 191-201.

▼**M3**

(61) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.

(62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269-275.

(63) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.

(64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65-75.

(65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In:* Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, стр. 463-467.

(66) Регламент (ЕО) № 850/2004 на Европейския парламент и на Съвета от 29 април 2004 г. относно устойчивите органични замърсители и за изменение на Директива 79/117/ЕИО, ОВ L 229, 30.4.2004 г., стр. 5.

▼M3

Допълнение 1

Определения

Анеуген: всяко вещество или процес, което/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 на една или повече от една хромозома, но не и на пълния(те) набор(и) от хромозоми (полиплоидия).

Апоптоза: програмирана клетъчна смърт, характеризираща се с редица етапи, водещи до разпадане на клетките на мембраносвързани частици, които впоследствие се премахват чрез фагоцитоза или разпространение.

Клетъчна пролиферация: увеличение на броя на клетките в резултат на митотично клетъчно делене.

Центромера: ДНК регион от хромозома, в който се свързват двете хроматиди и върху който двете кинетохори са прикрепени една до друга.

Кластоген: всяко вещество или процес, което/който причинява структурни хромозомни аберации в популации на клетки или 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 (CBPI): съотношението на клетки от второто делене в третираната популация, което има отношение към нетретираната контролна проба (вж. допълнение 2 за формула).

Цитостаза: потискане на растежа на клетките (вж. допълнение 2 за формула).

Цитотоксичност: вредни въздействия върху клетъчната структура или функция, които в крайна сметка причиняват клетъчна смърт.

Генотоксичен: общ термин, обхващащ всички видове увреждане на ДНК или хромозоми, включително разкъсвания, пренареждания на адукти, мутации, хромозомни аберации и анеуплоидия. Не всички видове генотоксични ефекти водят до мутации или трайно увреждане на хромозомите.

Интерфазни клетки: клетки, които не са във фаза на митоза.

Кинетохора: белтъчна структура, разположена около 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.

Микроядра: малки ядра, отделни от главното ядро и в допълнение към него, на клетките, произведени по време на телофазата на митоза или мейоза чрез изоставащи хромозомни фрагменти или цели хромозоми.

Митоза: делене на клетъчното ядро, обикновено разделено на профаза, прометафаза, метафаза, анафаза и телофаза.

Митотичен индекс: съотношението на клетките в метафаза, разделени на броя клетки, наблюдавани в клетъчната 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 структура от хромозоми (хромозомни аберации).

▼**M3**

Неспособност за отделяне: неспособност на двойката хроматиди да се отделят една от друга и правилно да се разделят, за да се обособят като хромозоми за развиващите се дъщерни клетки, в резултат на което се получават дъщерни клетки с анормален брой хромозоми.

Полиплоидия: числови хромозомни аберации в клетки или организми, включващи цял набор(и) от хромозоми в противовес на отделна хромозома или хромозоми (анеуплоидия).

Индекс на пролиферация (PI): метод за измерване на цитотоксичността, когато не се използва цитоВ (вж. допълнение 2 за формула).

Относителен ръст в количеството клетки (RICC): метод за измерване на цитотоксичността, когато не се използва цитоВ (вж. допълнение 2 за формула).

Относително удвояване на популации (RPD): метод за измерване на цитотоксичността, когато не се използва цитоВ (вж. допълнение 2 за формула).

Индекс на репликация (RI): съотношението на циклите на клетъчно делене, през които е преминала третирана култура, в сравнение с нетретирана контрола по време на периода на експозиция и възстановяване (вж. допълнение 2 за формула).

Изпитван химикал (също наричан изпитвано вещество): всяко вещество или смес, изпитвано(а) чрез използването на настоящия метод за изпитване.

▼M3

Допълнение 2

Формули за оценка на цитотоксичността

1. *Когато се използва цитоБ*, оценката на цитотоксичността следва да бъде основавана на индекса на пролиферация при блокиране на цитокинезата (CBPI) или на индекса на репликация (RI) (16) (58). CBPI посочва средния брой на клетъчните цикли на клетка по време на периода на експозиция на цитоБ и може да бъде използван за изчисляване на пролиферацията на клетките. RI посочва относителния брой на ядрата в третирани култури в сравнение с контролните култури и може да бъде използван за изчисляване на процента на цитостаза:

$$\text{Процент на цитостаза} = 100 - 100\{(CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1)\}$$

както и

T = култура за изпитване с третирания химикал

C = контролни култури, третирани с носителя

където:

$$CBPI = \frac{((\text{Брой едноядрени клетки}) + (2 \times \text{брой двуядрени клетки}) + (3 \times \text{брой многоядрени клетки}))}{(\text{Общ брой на клетките})}$$

Поради това CBPI на стойност 1 (всички клетки са едноядрени) е еквивалентен на 100 % цитостаза.

$$\text{Цитостаза} = 100 - RI$$

$$RI = \frac{((\text{Брой двуядрени клетки}) + (2 \times \text{брой многоядрени клетки})) \div (\text{общ брой на клетките})_T}{((\text{Брой двуядрени клетки}) + (2 \times \text{брой многоядрени клетки})) \div (\text{общ брой на клетките})_C} \times 100$$

T = третирани култури

C = контролни култури

2. Поради това RI на стойност 53 % означава, че в сравнение с броя на клетките, които са претърпели делене, за да образуват двуядрени и многоядрени клетки в контролната култура, само 53 % от този брой са претърпели делене в третираната култура, т.е. 47 % цитостаза.

3. *Когато не се използва цитоБ*, се препоръчва оценяване на цитотоксичността въз основа на относителния ръст в количеството клетки (RICC) или на относителното удвояване на популации (RPD) (58), тъй като и при двете се отчита съотношението на популацията на клетки, които са претърпели делене.

$$RICC = \frac{(\text{Увеличение на броя на клетките в третираните култури (крайно – начално)})}{(\text{Увеличение на броя на клетките в контролни култури (крайно – начално)})} \times 100$$

$$RPD = \frac{(\text{Брой на удвояванията на популации в третирани култури})}{(\text{Брой на удвояванията на популации в контролни култури})} \times 100$$

▼**M3**

където:

Удвояване на популации = [логаритъм (брой на клетките след третиране ÷ първоначален брой на клетките)] ÷ логаритъм 2

4. Поради това RICC или RPD на стойност 53 % показва 47 % цитотоксичност/цитостаза.

5. Чрез използване на индекса на пролиферация (PI) цитотоксичността може да бъде оценена чрез преброяване на броя на клонингите, които се състоят от 1 клетка (cl1), 2 клетки (cl2), 3 до 4 клетки (cl4) и 5 до 8 клетки (cl8)

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. PI е използван като ценен и надежден параметър за цитотоксичност и за клетъчни линии, култивирани *in situ* при липсата на цитоБ (25) (26) (27) (28).

▼M3

Допълнение 3

Препоръчителни референтни химикали за оценка на ефективността ([1])

Категория	Химикал	CAS №	ЕС №
1. Кластогени, активни без метаболитно активиране			
	Цитозин арабинозид	147-94-4	205-705-9
	Митомицин С	50-07-7	200-008-6
2. Кластогени, изискващи метаболитно активиране			
	Бензо[а]пирен	50-32-8	200-028-5
	Циклофосфамид	50-18-0	200-015-4
3. Анеугени			
	Колхицин	64-86-8	200-598-5
	Винбластин	143-67-9	205-606-0
4. Вещества, даващи отрицателен резултат			
	Ди(2-етил-хексил)фталат	117-81-7	204-211-0
	Налидиксова киселина	389-08-2	206-864-7
	Пирен	129-00-0	204-927-3
	Натриев хлорид	7647-14-5	231-598-3

([1]) Референтните химикали са препоръчителните за използване химикали. Заместване или добавяне на химикали към списъка на референтните химикали може да бъде направено, ако е известна тяхната активност и ако те индуцират микроядра чрез същите механизми за действие, както и ако е доказано, че имат отношение към химикалите, които ще бъдат изпитвани чрез използването на процедурата MNvit. В зависимост от целта обосновката би могла също така да включва изследване за валидиране, използващо голямо разнообразие от вещества или насочено към по-тесен спектър въз основа на химичния клас на изпитваното вещество или изпитвания механизъм на увреждане.

▼M3

Б.50. **КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛОКАЛНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ: DA**

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Указанията за изпитването на химикали на ОИСР 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 сенсибилизация при мишки — изследването на локалните лимфни възли (LLNA, Указание за изпитване 429 на ОИСР) — 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 (ATP) 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 сенсибилизатори, както и на химикалите, които не предизвикват кожна сенсибилизация (10) (11) (12) (13). Този МИ е предназначен за оценка на потенциала на химикалите (вещества и смеси) да предизвикват кожна сенсибилизация при животни. В глава Б.6 от настоящото приложение и в Указание за изпитване 406 на ОИСР 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 ОИСР) и двете му нерадиоактивни изменения: LLNA: DA (глава Б.50 от настоящото приложение; Указание за изпитване 442 А на ОИСР) и LLNA: BrdU-ELISA (глава Б.51 от настоящото приложение; Указание за изпитване 442 Б на ОИСР) — всички те предоставят предимство спрямо изследванията върху морски свинчета в Б.6 и Указание за изпитване 406 на ОИСР (14), що се отнася до намаляването на и усъвършенстването при използването на животни.

2. Подобно на LLNA, LLNA: DA проучва индукционната фаза при кожна сенсибилизация и осигурява количествени данни, подходящи за оценяване на зависимостта доза—отговор. Освен това способността за откриване на кожни сенсибилизатори 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 сенсибилизатори, което още повече би могло да намали използването на морски свинчета за изпитване на потенциала за кожна сенсибилизация (т.е. Б.6; Указание за изпитване 406 на ОИСР) (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 сенсибилизатори, 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 ОИСР) (14), а по-скоро че изпитването е равностойно и може да бъде използвано като

▼M3

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 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: DA е подходящо за изпитваното веществото (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 сенсибилизираща 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 ОИСР) (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 сенсибилизация, тъй като за разлика от Б.6 и Указание за изпитване 406 на ОИСР 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 ОИСР (14), съществуват определени ограничения, които могат да доведат до необходимост от използване на Б.6 или на Указание за изпитване 406 на ОИСР (напр. изпитването на определени метали, фалшиво положителни резултати при определени кожни дразнители) [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 ОИСР (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 (ATP) (напр. вещества, които действат като инхибитори на ATP), или такива, които влияят на точното измерване на вътреклетъчния ATP (напр. наличието на ATP-разграждащи ензими, наличието на извънклетъчен ATP 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 ≥ 1,8 (вж. точка 6), за които изследването LLNA: DA: правилно е определило всички 32 сенсибилизатора при LLNA, но неправилно е определило три от 12-те вещества, които не са сенсибилизатори 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 сенсибилизаторите 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 сенсибилизацията. 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

▼M3

група, наречено SI, е предварително определено и следва да бъде ≥ 1,8, за да може изпитваното вещество да бъде оценено по-нататък като потенциален кожен сенсибилизатор. Описаните тук процедури се основават на измерването на съдържанието на ATP чрез използването на биолуминесценция (за която е известно, че корелира с броя на живите клетки) (17) за показване на увеличения брой на пролифериращите клетки в дрениращите аурикуларни (ушни) лимфни възли (18) (19). Биолуминесцентният метод използва ензима луцифераза за катализиране на образуването на светлина от ATP и луциферин съгласно следната реакция:

$$ATP + Луциферин + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Оксилуциферин + AMP + PP_i + CO_2 + светлина$$

Интензитетът на излъчваната светлина е в линейна зависимост от концентрацията на ATP и се измерва чрез използването на луминометър. Изпитването луциферин—луцифераза е чувствителен метод за количествено определяне на ATP 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 CBA/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/носители и ако е необходимо, да се разредят 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 сенсибилизиращо 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 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: 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 ≥ 1,8 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 > 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 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 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 сенсибилизация 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 скорошна 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 солюбилизатори (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 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 $\geq$ 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 скорошна 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. Дренiращите 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 разстлала 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 (АТП) в лимфоцитите)

27. Увеличенията в съдържанието на АТР в лимфните възли се измерват чрез метода луциферин/луцифераза, като се използва комплект за измерване на АТР, с който се измерва биолуминесценцията в относителни единици луминесценция (RLU). Времетраенето на изпитването от момента на умъртвяване на животното до измерване на съдържанието на АТР за всяко отделно животно следва да е еднакво, в рамките на приблизително 30 минути, тъй като се счита, че съдържанието на АТР постепенно намалява с времето след умъртвяване на животното (12). Поради това сериите от процедури от отрязването на аурикуларните (ушни) лимфни възли до измерването на АТР следва да бъдат завършени в рамките на 20 минути съгласно предварително определения времеви график, който е един и същ за всяко животно. Луминесценцията на АТР следва да бъде измерена във всяка проба с обем 2 mL, така че да бъдат събрани общо две измервания на АТР за всяко животно. След това се определя средната луминесценция на АТР 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 ≥ 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 сенсибилизатори, 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 ЕС 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 за комплекта за ATP;

— 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 графиците 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 животното и време на измерване на ATP 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 вариабилността, която отчита вариабилността 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 сенсибилизатор.

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/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.

(14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline № 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., Dreessen, 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/acutetox/Tox_workshop.htm]

(36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 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 сенсибилизация, 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 сенсибилизация: 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 сенсибилизация.

Стимулационен индекс (SI): стойност, изчислявана за оценка на потенциала на дадено изпитвано вещество да предизвиква кожна сенсибилизация, 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.

▼M3

Б.51. **КОЖНА СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ: ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛОКАЛНИТЕ ЛИМФНИ ВЪЗЛИ: BRDU-ELISA**

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Указанията за изпитването на химикали на ОИСР 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 сенсибилизация при мишки — Изследването на локалните лимфни възли (LLNA, Указание за изпитване 429 на ОИСР) — 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 сенсибилизатори, както и на химикалите, които не предизвикват кожна сенсибилизация, с известни ограничения (10) (11) (12). Този МИ е предназначен за оценка на потенциала на химикалите (вещества и смеси) да предизвикват кожна сенсибилизация при животни. Глава Б.6 от настоящото приложение и Указание за изпитване 406 на ОИСР 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 ОИСР) и двете му нерадиоактивни изменения: LLNA: BrdU-ELISA (глава Б.51 от настоящото приложение; Указание за изпитване 442 Б на ОИСР) и LLNA: DA (глава Б.50 от настоящото приложение; Указание за изпитване 442 А на ОИСР) — всички те предоставят предимство спрямо изследванията върху морски свинчета в Б.6 и Указание за изпитване 406 на ОИСР (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 сенсибилизация и осигурява количествени данни, подходящи за оценяване на зависимостта доза—отговор. Освен това способността за откриване на кожни сенсибилизатори 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 сенсибилизатори, което още повече би могло да намали използването на морски свинчета за изпитване на потенциала за кожна сенсибилизация (т.е. Б.6; Указание за изпитване 406 на ОИСР) (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 сенсибилизатори, 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 ОИСР) (13), а по-скоро че изпитването е равностойно и може да бъде използвано като алтернатива, при която обикновено положителните и отрицателните резултати вече не изискват

▼M3

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 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 веществото (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 сенсибилизираща 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 ОИСР) (13). Освен това LLNA: BrdU-ELISA предлага съществено усъвършенстване на начина, по който животните се използват за изпитване на алергичната контактна сенсибилизация, тъй като за разлика от глава Б.6 и Указание за изпитване 406 на ОИСР, 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 ОИСР (13), съществуват определени ограничения, които могат да доведат до необходимост от използване на Б.6 или на Указание за изпитване 406 на ОИСР (напр. изпитването на определени метали, погрешно положителни резултати при определени кожни дразнители) [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 (15), могат да доведат до необходимост от използване на изследванията върху морски свинчета (т.е. Б.6; Указание за изпитване 406 на ОИСР (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 ≥ 1,6 (вж. точка 6), за които изследването LLNA: BrdU-ELISA правилно е определило всички 32 сенсибилизатора при LLNA, но неправилно е определило две от 11-те вещества, които не са сенсибилизатори 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 сенсибилизаторите предизвикват пролиферация на лимфоцитите в лимфните възли, дренiращи 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 сенсибилизацията. 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 ≥ 1,6, преди да се гарантира по-нататъшната оценка на тест-субстанцията като

▼M3

потенциален кожен сенсибилизатор. Описаните тук процедури се основават на измерването на съдържанието на BrdU за показване на увеличения брой на пролифериращите клетки в дренiращите аурикуларни (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 разредят 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 сенсибилизиращо 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

▼M3

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 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 ≥ 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 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 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 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 сенсибилизация 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 инкорпорирането на подходящи солюбилизатори (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 ≥ 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 скорошна 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. Подробности 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-микронови 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-микронови 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 антитяло анти-BrdU и се дава възможност за реакция. Впоследствие антитялото 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:

$$\text{Индекс на маркиране на BrdU} = (ABS_{em} - \text{ABS празна проба}_{em}) - (ABS_{ref} - \text{ABS празна проба}_{ref})$$

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 ≥ 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 сенсибилизатори, 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, 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“).

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 ЕС 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 антитялото 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 графиците 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 вариабилността, която отчита вариабилността 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 сенсибилизатор.

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., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. 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.l 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 сенсибилизация, 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 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 сенсибилизация: 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 сенсибилизация.

Стимулационен индекс (SI): стойност, изчислявана за оценка на потенциала на дадено изпитвано вещество да предизвиква кожна сенсибилизация, 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.

▼M4

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

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е равностоен на Указание за изпитване 436 на ОИСР (ОИСР 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 счетено за уместно след приемането на прераработения 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 показа, че методът е подходящ за използване за целите на класифицирането и етикетирането (6). Методът при клас остра токсичност за изпитване на остра инхалаторна токсичност ще позволи използването на последователни стъпки от фиксирани целеви концентрации за степенуване на токсичността на изпитваните химикали. Смъртността се използва като ключова крайна точка, обаче животните, изпитващи силна болка или дистрес, страдание или неизбежна смърт, следва да бъдат умъртвени по хуманен начин за да бъде сведено до минимум страданието. Насоки за хуманен край са дадени в Ръководството на ОИСР № 19 (7).

2. Указания за провеждането на и интерпретирането по настоящия метод за изпитване могат да бъдат намерени в Ръководство № 39 за изпитвания на остра инхалаторна токсичност (GD 39) (8).

3. Определенията, използвани в контекста на настоящия метод за изпитване, са дадени в допълнение 1 и в GD 39 (8).

4. Настоящият метод за изпитване осигурява информация за опасните свойства и позволява изпитваният химикал да бъде категоризиран и класифициран съгласно Регламент (ЕО) № 1272/2008 за класифициране на химикали, които причиняват остра токсичност (9). В случай че се изискват точкови оценки на стойности на LC_{50} 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 ОИСР TG 435 (12), стойности на pH, информация за аналогични химикали или всякакви други подходящи данни.

▼M4

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

6. Принципът на изпитването е, че въз основа на поетапна процедура се получава достатъчна информация за острата инхалаторна токсичност на изпитвания химикал за период на експозиция от 4 часа, за да се даде възможност за неговото класифициране. Друга продължителност на експозицията може да се прилага за изпълнение на специфични регулаторни цели. Изпитват се по 3 животни от всеки пол, независимо на коя от определените стъпки на концентрацията. В зависимост от смъртността и/или терминалното състояние на животните 2 стъпки могат да бъдат достатъчни за оценка относно острата токсичност на изпитвания химикал. Ако са налице доказателства, че единият пол е по-възприемчив от другия, изпитването може да бъде продължено само с по-възприемчивия пол. Резултатите от предходната стъпка определят следващата стъпка така, че:

   а) не е необходимо по-нататъшно изпитване;

   б) изпитване на три животни от пол; или

   в) изпитване с 6 животни само от по-възприемчивия пол, т.е. очакванията за по-ниската граница в класа токсичност следва да се основават на 6 животни във всяка група за изпитване на определена концентрация, независимо от техния пол.

7. Умиращи животни или животни, очевидно изпитващи болка или показващи признаци на силен и продължителен дистрес, следва да бъдат умъртвени по хуманен начин, като при интерпретирането на резултатите от изпитванията те се 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 № 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 ± 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 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

▼M4

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 уравновесяване. Различна продължителност може да е необходима за изпълнение на специфични изисквания, но следва да се даде обосновка в доклада от изследването [вж. GD 39 (8)]. Животните, експонирани в камери за цялото тяло, следва да се 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 ± 10 % за газовете и парите или не повече от ± 20 % за течните или твърдите аерозоли. Времето за уравновесяване 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 поглътител 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 заключение данни, които могат да доведат до необходимост от повтаряне на дадена експозиция. Определяне на размера на частиците трябва да бъде направено за пари, ако съществува вероятност кондензация на парите да доведе до образуване на аерозол, или ако бъдат открити частици в атмосфера от пари с потенциал за смесени фази (вж. точка 14).

ПРОЦЕДУРА

Основно изпитване

25. За всяка стъпка се използват по три животни от пол, или шест животни от по-възприемчивия пол. Ако експозиция на вид гризач, различен от плъх, е само през носа, максималната продължителност на експозицията може да бъде адаптирана така, че да се минимизира специфичният за този вид дистрес. Равнището на концентрация, което се използва като начална доза, се избира от едно от четири фиксирани равнища и равнището на началната концентрация следва да бъде това, при което с най-голяма вероятност се постига токсичност в някои от животните, на които се прилага дозата. Схемите за изпитване за газове, пари и аерозоли (включени в допълнения 2—4) представляват изпитване с граничните стойности на категории 1—4 от регламента относно класифицирането, етикетирането 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 обосновка в доклада от изследването. В случай на потенциално взривоопасни изпитвани химикали следва да се положат усилия за избягване на условия, предразполагащи експлозия. С оглед избягване на ненужно използване на изпитвани животни следва да се извърши изпитване без животни преди изпитването при пределна концентрация, за да се гарантира, че в камерата могат да бъдат постигнати условията за изпитването при пределна концентрация.

НАБЛЮДЕНИЯ

29. Върху животните трябва да бъдат извършвани чести клинични наблюдения по време на периода на експозиция. След експозицията клинични наблюдения следва да бъдат извършвани най-малко два пъти в деня на експозиция, или по-често, ако има показания от отговора на животните на третирането, и най-малко един път дневно след това общо в продължение на 14 дни. Продължителността на периода на наблюдение не е фиксирана, но следва да се определя от характера и времето на поява на клиничните признаци и от продължителността на възстановителния период. Моментите във времето, в които признаците на токсичност се появяват и изчезват, са важни, особено ако съществува тенденция към забавяне появата на признаците на токсичност. Всички наблюдения систематично се записват с индивидуални архиви, които се поддържат за всяко животно. Животните, намерени в терминално състояние, и животните, показващи признаци на силна болка и/или продължителни признаци на силен дистрес, следва да бъдат умъртвени по хуманен начин по причини, свързани с хуманното отношение към животните. При провеждането на изпитвания за клинични признаци на токсичност трябва да се внимава първоначално трудно забележимите и преходните респираторни промени в резултат от процедурата по експозицията да не бъдат взети погрешно за ефекти, свързани с третирането. Следва да бъдат взети предвид принципите и критериите, резюмирани в Ръководството за хуманен край (7). Когато животните са умъртвени по хуманни причини или са намерени мъртви, времето на смъртта им следва да бъде записано колкото е възможно по-точно.

▼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 отбелязвано, когато е възможно. Вниманието следва да бъде насочено към наблюдения на треперене, конвулсии, слюноотделяне, диария, летаргия, сън и кома. Измерването на ректалната температура може да предостави подкрепящи доказателства за рефлекторно забавено дишане или хипотермия/хипертермия, свързани с третирането или затвореното пространство.

Телесно тегло

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

Патология

32. Всички изпитвани животни, включително умрелите по време на изпитването или подложените на евтаназия и извадени от изследването поради причини, свързани с хуманното отношение към животните, следва да бъдат подложени на макроскопска аутопсия. Ако аутопсията не може да се извърши веднага след откриването на мъртвото животно, трупът на животното трябва да бъде охладен (но не замразен) при температури, достатъчно ниски за да бъде сведена до минимум 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.

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 уравновесяване на инхалационната камера (t_{95}),

— брой изменения на обема на час,

— измервателни прибори (ако е приложимо);

Данни за експозицията

— обосновка за избора на целева концентрация в основното изследване,

— номинални концентрации (обща маса на изпитвания химикал, генерирана в инхалационната камера, разделена на преминалия през камерата обем въздух),

— действителни концентрации на изпитвания химикал, взети от зоната на дишане на животните; за изпитвани смеси, които произвеждат хетерогенни физични форми (газове, пари, аерозоли), всяка от тези форми може да бъде анализирана отделно,

— всички концентрации във въздуха следва да бъдат докладвани в единици за масова концентрация (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 LC_{50};

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 ОИСР за хуманен край (7).

ПРЕПРАТКИ:

(1) Глава Б.2 от настоящото приложение („Остра токсичност (инхалаторна)“).

(2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.

(3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

(4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} 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.

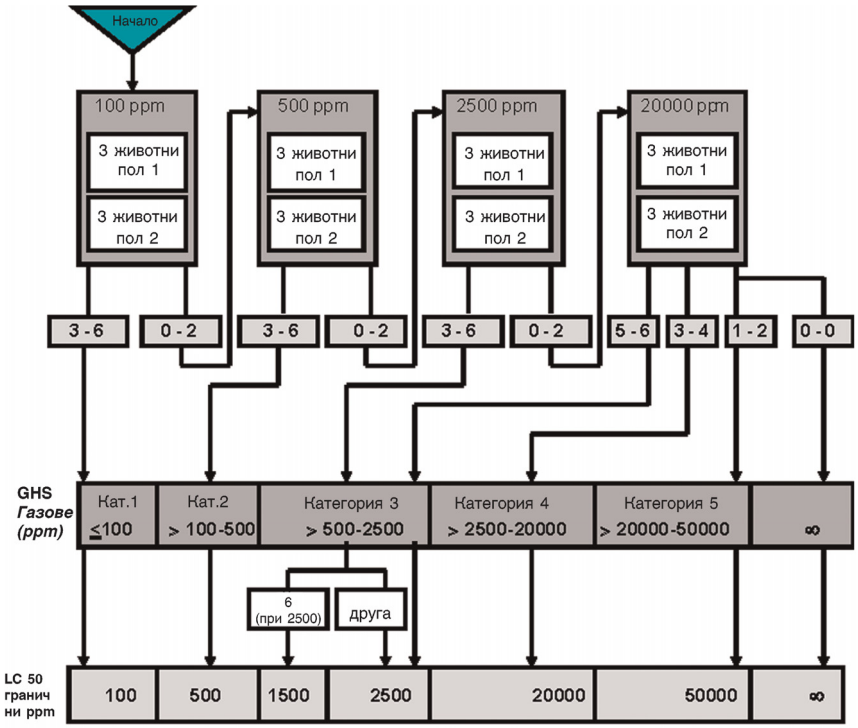
([1]) В следващите таблици се прави препратка към Глобалната хармонизирана система за класифициране и етикетиране на химикалите (GHS). В рамките на ЕС равностоен е Регламент (ЕО) № 1272/2008. В случай на остра инхалаторна токсичност по Регламент (ЕО) № 1272/2008 (9) не се прилага категория 5.

▼M4

Допълнение 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

— ∞: некласифицирано

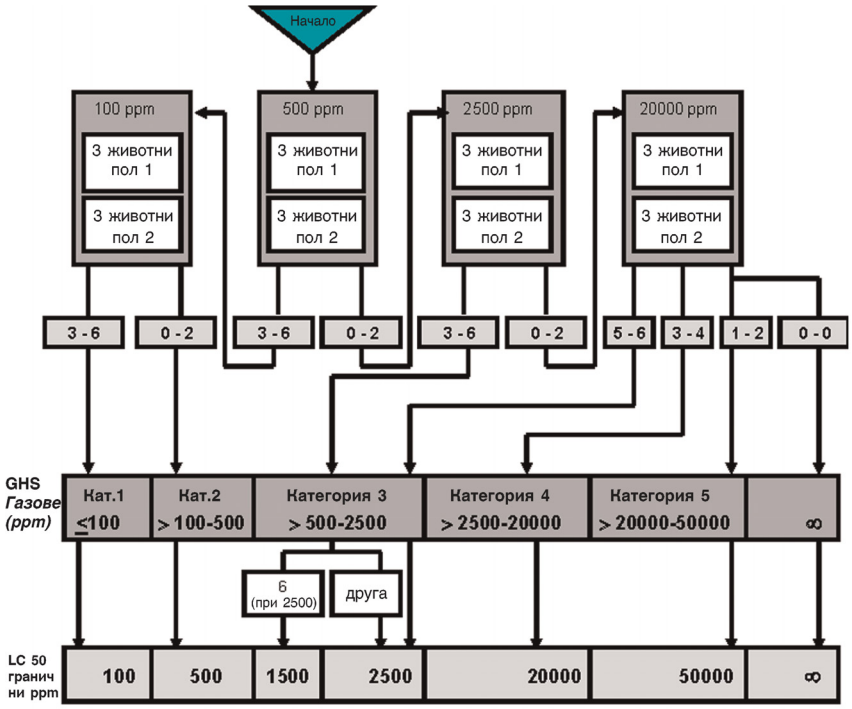
— Изпитване при ≥ 20000 ppm/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼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

— ∞: некласифицирано

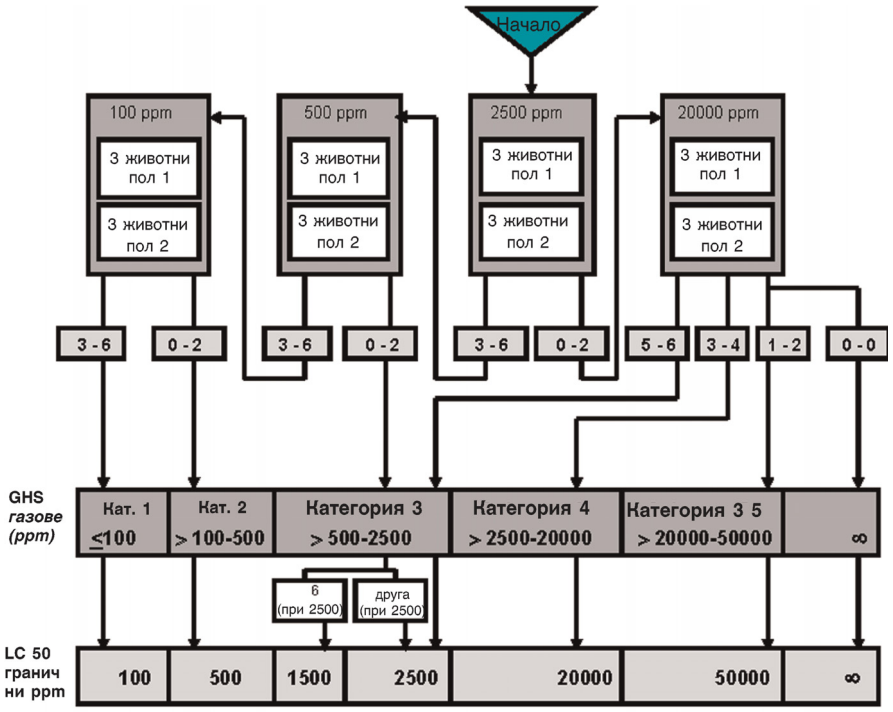
— Изпитване при ≥ 20000 ppm/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼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

— ∞: некласифицирано

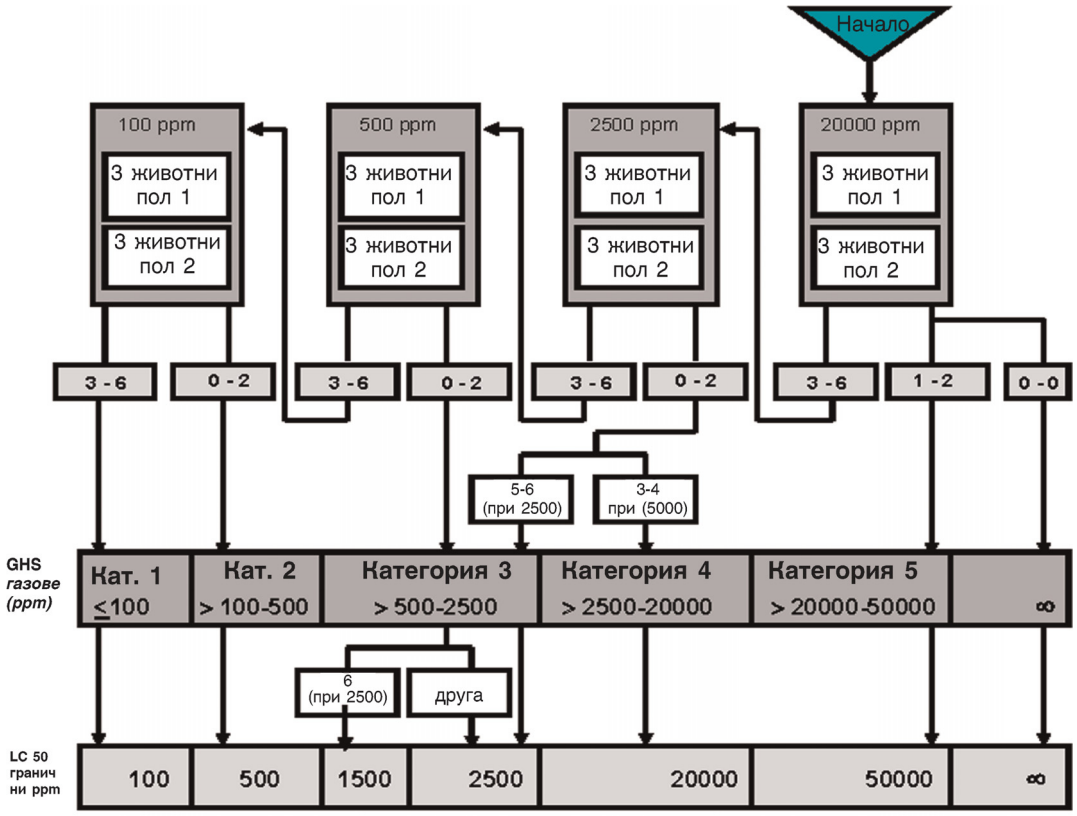
— Изпитване при ≥ 20000 ppm/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼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

— ∞: некласифицирано

— 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.

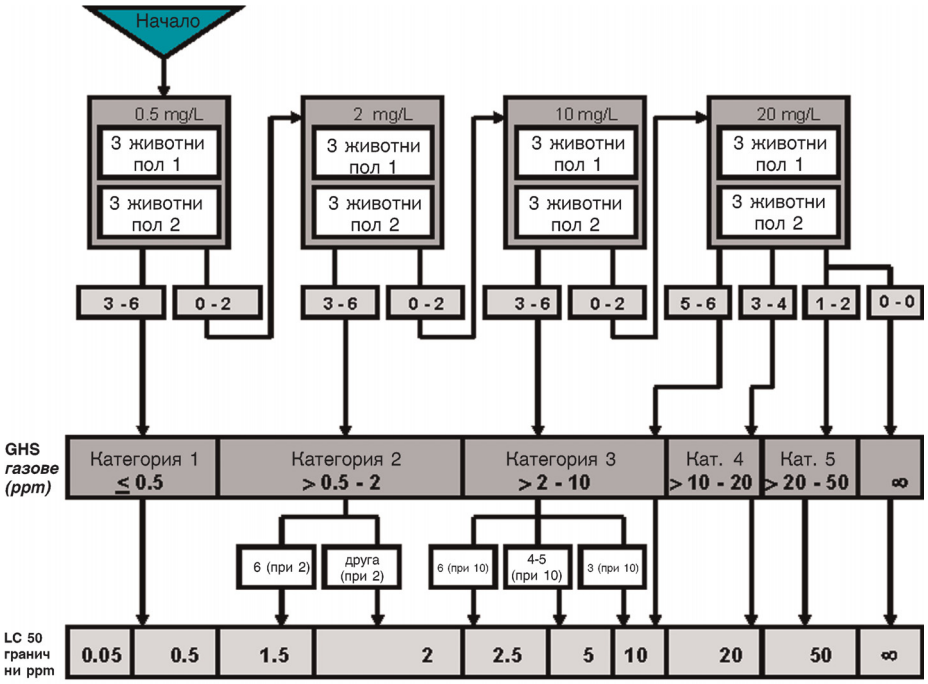
([1]) В следващите таблици се прави препратка към Глобалната хармонизирана система за класифициране и етикетиране на химикалите (GHS). В рамките на ЕС равностоен е Регламен (ЕО) № 1272/2008. В случай на остра инхалаторна токсичност по Регламент (ЕО) № 1272/2008 (9) не се прилага категория 5.

▼M4

Допълнение 3а

Остра инхалаторна токсичност:

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



— Използват се 3 ♂ + 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

— ∞: некласифицирано

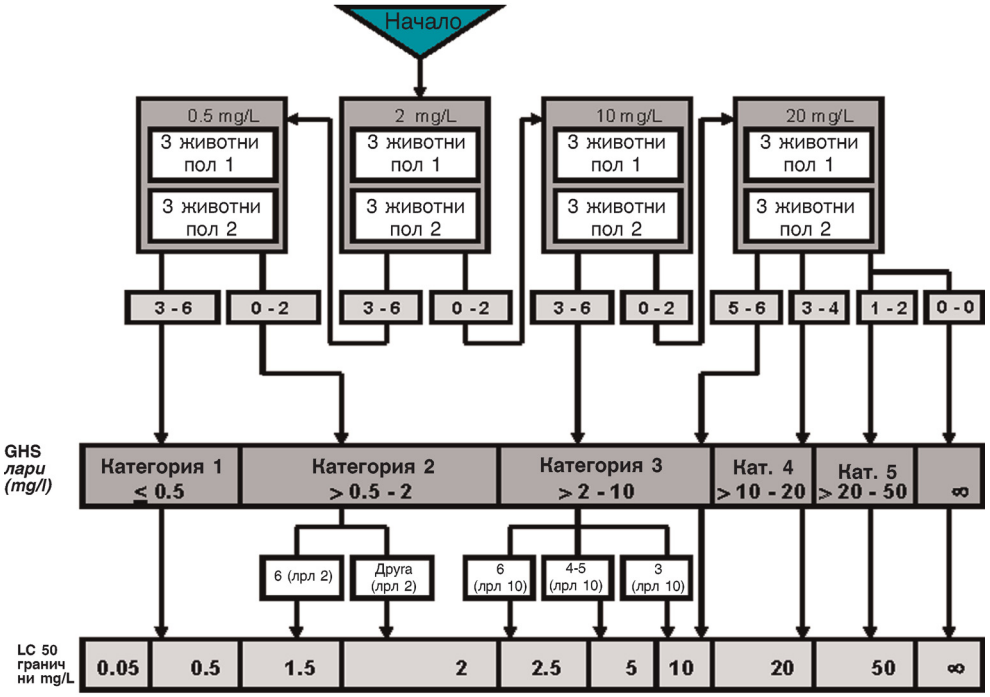
— Изпитване при 50 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼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

— ∞: некласифицирано

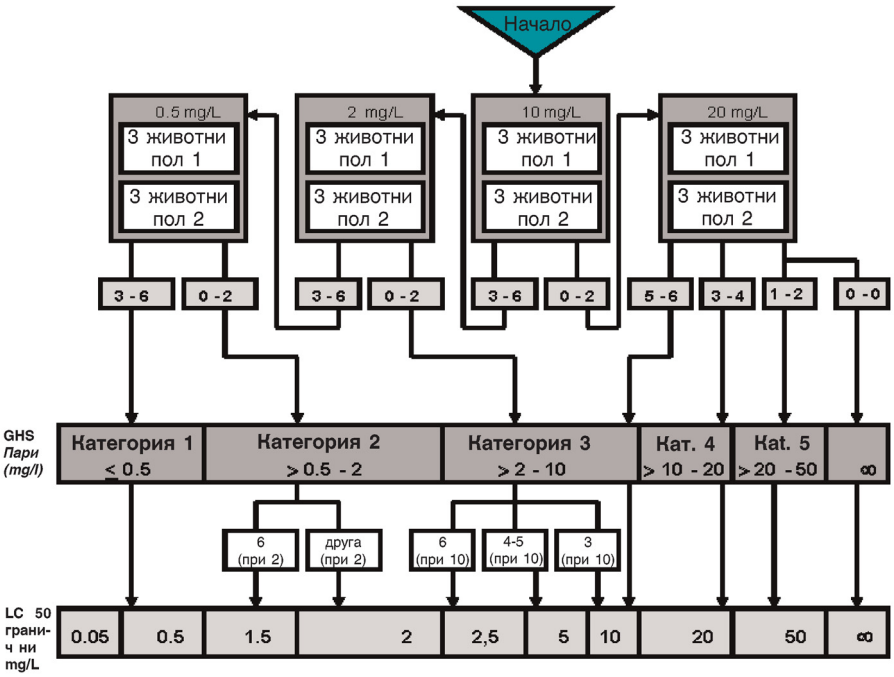
— Изпитване при 50 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼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

— ∞: некласифицирано

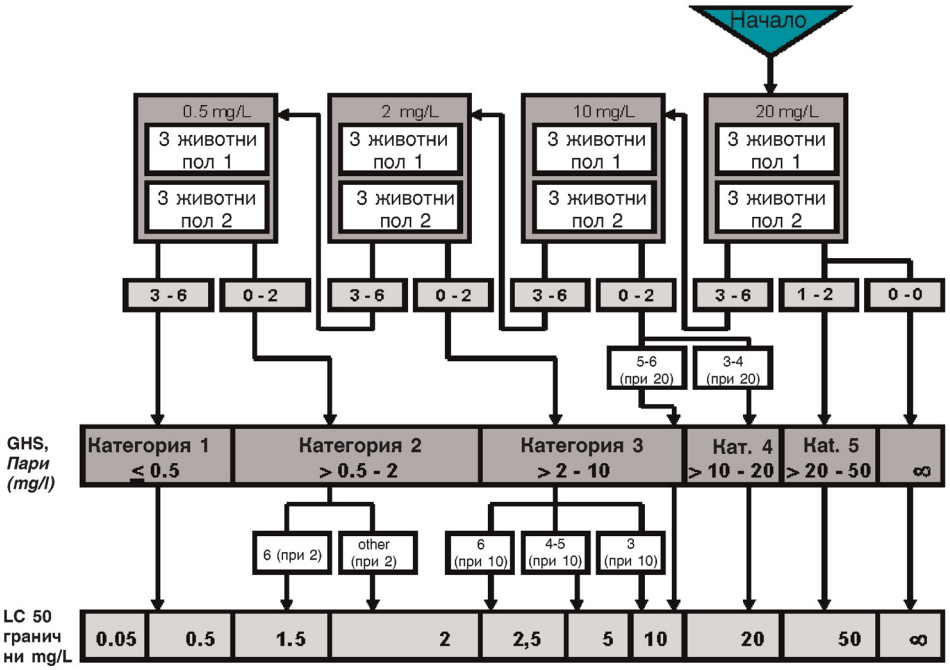
— Изпитване при 50 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼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 умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване

— GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране

— ∞: некласифицирано

— 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.

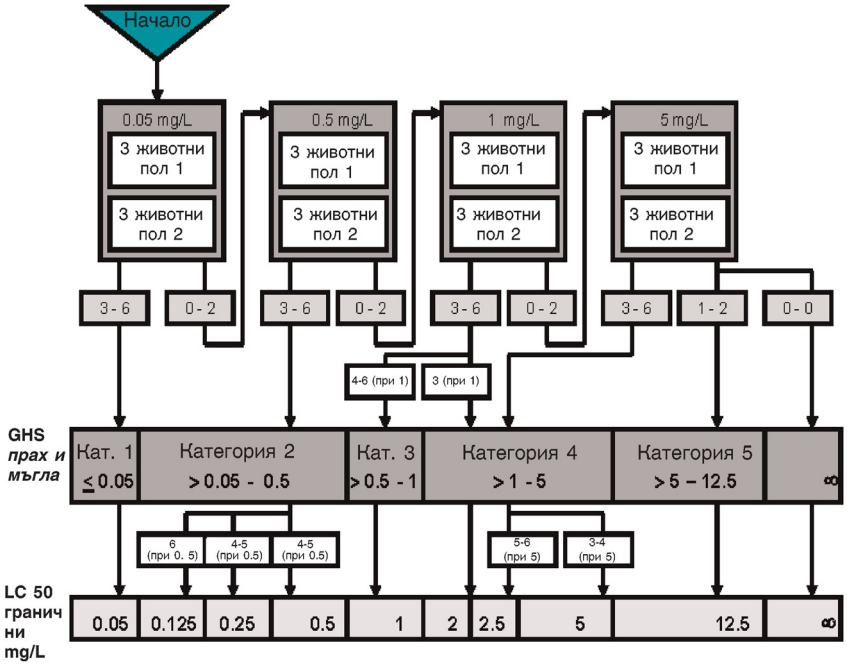
([1]) В следващите таблици се прави препратка към Глобалната хармонизирана система за класифициране и етикетиране на химикалите (GHS). В рамките на ЕС равностоен е Регламен (ЕО) № 1272/2008. В случай на остра инхалаторна токсичност по Регламент (ЕО) № 1272/2008 (9) не се прилага категория 5.

▼M4

Допълнение 4а

Остра инхалаторна токсичност

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



— Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка

— 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване

— GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране

— ∞: некласифицирано

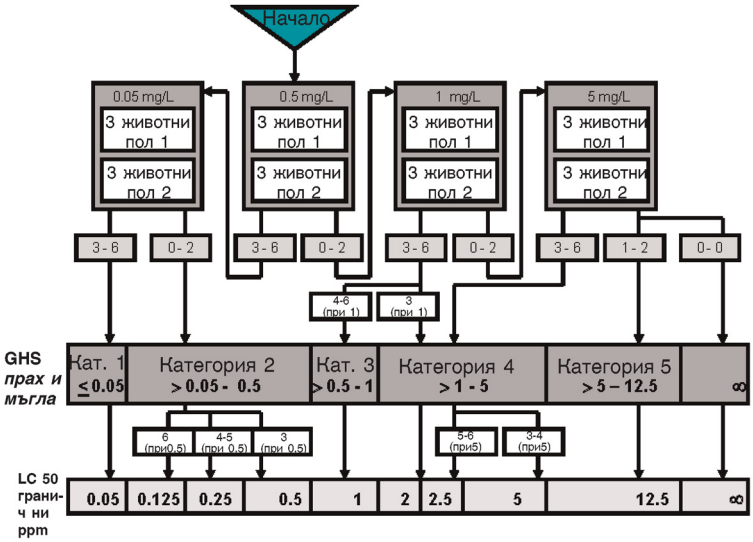
— Изпитване при 50 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼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

— ∞: некласифицирано

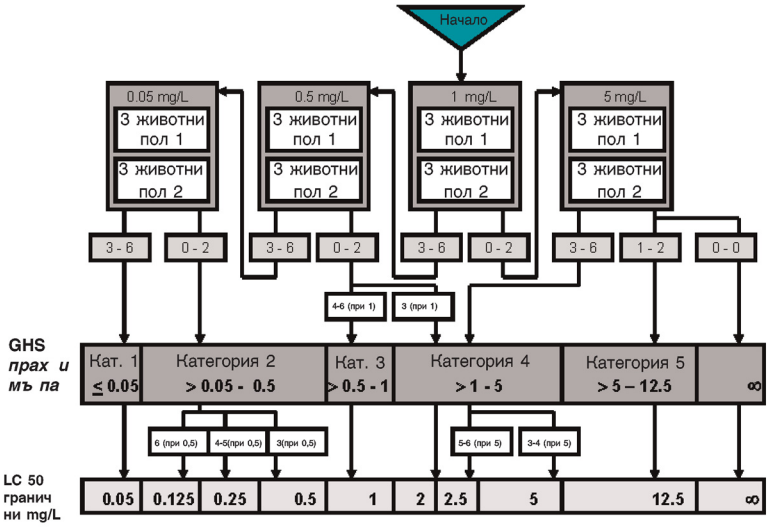
— Изпитване при 50 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼M4

Допълнение 4в

Остра инхалаторна токсичност

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



— Използват се 3 ♂ + 3 ♀, или 6 животни от по-възприемчивия пол на стъпка

— 0-6: Брой умиращи или умрели животни/концентрация на изпитване

— GHS: Глобална хармонизирана система за класифициране

— ∞: некласифицирано

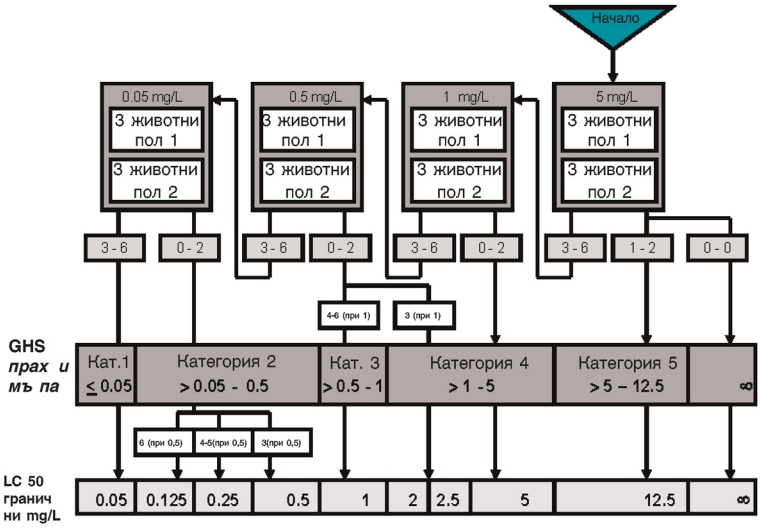
— Изпитване при 12,5 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)

▼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

— ∞: некласифицирано

— Изпитване при 12,5 mg/L/4h: Вж. Ръководство 39 (8)“

▼**B**

Част B: МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕТО НА ЕКОЛОГИЧНА ТОКСИЧНОСТ

СЪДЪРЖАНИЕ

B.1.	ОСТРА ТОКСИЧНОСТ ЗА РИБА
B.2.	*DAPHNIA* SP. ИЗПИТВАНЕ ЗА ОСТРА ИМОБИЛИЗАЦИЯ
B.3.	СЛАДКОВОДНИ ВОДОРАСЛИ И ЦИАНОБАКТЕРИИ, ИЗПИТВАНЕ ЗА ПОТИСКАНЕ НА РАСТЕЖА
B.4.	ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПРЯКАТА БИОЛОГИЧНА РАЗГРАДИМОСТ
ЧАСТ I.	ОБЩИ СЪОБРАЖЕНИЯ
ЧАСТ II.	ОПРЕДЕЛЯНЕ НА DOC ЧРЕЗ СКОРОСТТА НА ОТМИРАНЕ (МЕТОД B.4-A)
ЧАСТ III.	МОДИФИЦИРАН СКРИНИНГ НА ОИСР (МЕТОД B.4-Б)
ЧАСТ IV.	МЕТОД ЗА ОТДЕЛЯНЕ НА CO_2 (МЕТОД B.4-B)
ЧАСТ V.	ИЗПИТВАНЕ ЧРЕЗ МАНОМЕТРИЧНА РЕСПИРОМЕТРИЯ (МЕТОД B.4-Г)
ЧАСТ VI.	ИЗПИТВАНЕ ПО МЕТОДА НА ИЗОЛИРАНИТЕ ПРОБИ (МЕТОД B.4-Д)
ЧАСТ VII.	ИЗПИТВАНЕ ПО M.I.T.I. (МЕТОД B.4-E)
B.5.	РАЗГРАЖДАНЕ – БИОХИМИЧНА ПОТРЕБНОСТ ОТ КИСЛОРОД
B.6.	РАЗГРАЖДАНЕ – ХИМИЧНА ПОТРЕБНОСТ ОТ КИСЛОРОД
B.7.	РАЗГРАЖДАНЕ – АБИОТИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ: ХИДРОЛИЗА КАТО ФУНКЦИЯ ОТ PH
B.8.	ТОКСИЧНОСТ ЗА ЗЕМНИ ЧЕРВЕИ.
B.9.	БИОЛОГИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ – ИЗПИТВАНЕ С ИЗКУСТВЕНА ПОЧВА
B.10.	ИЗПИТВАНЕ ЗА СИМУЛИРАНЕ НА АЕРОБНО ПРЕЧИСТВАНЕ НА ОТПАДЪЧНИ ВОДИ: B.10-A: МОДУЛИ С АКТИВНА УТАЙКА — B.10-Б: БИОФИЛМИ
B.11.	БИОЛОГИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ – ИЗПИТВАНЕ ЗА ПОТИСКАНЕ ДИШАНЕТО НА АКТИВИРАНА УТАЙКА
B.12.	БИОЛОГИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ – МОДИФИЦИРАНО SCAS ИЗПИТВАНЕ
B.13	БИОКОНЦЕНТРАЦИЯ: ПРОТОЧЕН ТЕСТ ВЪРХУ РИБИ
B.14.	ТЕСТВАНЕ РАСТЕЖА НА МЛАДИТЕ РИБИ
B.15.	РИБИ, КРАТКОСРОЧЕН ТЕСТ ЗА ТОКСИЧНОСТ ПРИ ЕМБРИОНИТЕ И ИНДИВИДИТЕ В СТАДИЙ НА ХРАНЕНЕ ОТ ЖЪЛТЪЧНАТА ТОРБИЧКА
B.16.	МЕДОНОСНА ПЧЕЛА – ТЕСТ ЗА ОСТРА ОРАЛНА ТОКСИЧНОСТ
B.17.	МЕДОНОСНА ПЧЕЛА – ТЕСТ ЗА ОСТРА КОНТАКТНА ТОКСИЧНОСТ
B.18.	АДСОРБЦИЯ/ДЕСОРБЦИЯ ЧРЕЗ ИЗПОЛЗВАНЕ МЕТОДА ЗА РАВНОВЕСИЕ В ГРУПАТА

▼**B**

B.19.	ИЗЧИСЛЯВАНЕ КОЕФИЦИЕНТА НА АДСОРБЦИЯ (K_{OC}) НА ПОЧВАТА И НА УТАЙКАТА ОТ ОТПАДНИ ВОДИ, ИЗПОЛЗВАЩИ ВИСОКОЕФЕКТИВНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЯ (HPLC)
B.20.	ТЕСТ ЗА ВЪЗПРОИЗВЕЖДАНЕ НА ГИГАНТСКА ВОДНА БЪЛХА
B.21.	ПОЧВЕНИ МИКРООРГАНИЗМИ: ИЗПИТВАНЕ НА АЗОТНАТА ТРАНСФОРМАЦИЯ
B.22.	ПОЧВЕНИ МИКРООРГАНИЗМИ: ИЗПИТВАНЕ НА ВЪГЛЕРОДНАТА ТРАНСФОРМАЦИЯ
B.23.	АЕРОБНА И АНАЕРОБНА ТРАНСФОРМАЦИЯ В ПОЧВИ
B.24.	АЕРОБНА И АНАЕРОБНА ТРАНСФОРМАЦИЯ ВЪВ ВОДНИ СЕДИМЕНТНИ СИСТЕМИ
B.25.	АЕРОБНА МИНЕРАЛИЗАЦИЯ В ПОВЪРХНОСТНИ ВОДИ — СИМУЛАЦИОННО ИЗПИТВАНЕ ЗА БИОРАЗГРАЖДАНЕ
B.26.	ИЗПИТВАНЕ ПОТИСКАНЕТО НА РАСТЕЖА НА ВИДА *LEMNA*

▼**M4**

B.27.	ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ЗА ХИРОНОМИДИ В СИСТЕМА ВОДА–СЕДИМЕНТ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА СЕДИМЕНТ С ДОБАВКА
B.28.	ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ЗА ХИРОНОМИДИ В СИСТЕМА ВОДА–СЕДИМЕНТ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА ВОДА С ДОБАВКА
B.29.	ЛЕСНА БИОРАЗГРАДИМОСТ — CO_2 В ЗАПЕЧАТАНИ СЪДОВЕ (ИЗПИТВАНЕ В СВОБОДНОТО ПРОСТРАНСТВО НАД ТЕЧНОСТТА)
B.30.	БИОАКУМУЛАЦИЯ В СУХОЗЕМНИ ОЛИГОХЕТИ

▼B

B.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 ($mg.kg^{-1}$).

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 pH. Ако се появят симптоми за настъпили промени в pH, препоръчва се тестът да бъде повторен с регулиране на pH и резултатите да се отбележат. В този случай стойността на pH на стандартния разтвор следва да се нагласи към стойността на pH на водата за разреждане, освен ако няма специфични причини това да не се направи. Предпочитани за целта са HCl и NaOH. Това регулиране на pH 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 pH 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 $CaCO_3$) и с pH 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;

— pH-метър.

1.6.3. **Опитна риба**

Рибите следва да са в добро здраве и да нямат никакви малформации.

▼B

Използваните 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 (рециркулация или постоянно водоподаване) 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 pH, 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 LC_{50} 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 (pH, 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 pH 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 LC_{50} на всеки от препоръчителните интервали за наблюдение (при 95 % допустима точност);

— използвани статистически процедури при определяне стойностите на LC_{50};

— 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 fur 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 fur 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 μScm^{-1}.

Апаратурата за дестилиране на вода не следва да съдържа части, изработени от мед.

Стандартни разтвори

$CaCl_2.2H_2O$ (калциев хлорид дихидрат)	11,76 g
Разтваря се във вода и се долива до 1 литър.	
$MgSO_4.7H_2O$ (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 ± 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.

▼B

Допълнение 2

Препоръчителни видове риба за провеждане на изпитванията

Препоръчани видове	Препоръчан обхват на температурата за изпитване (°C)	Препоръчана обща дължина на експеримент-алното животно (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Рибка-зебра	От 20 до 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Бодливка	От 20 до 24	5,0 ± 2,5
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Обикновен шаран	От 20 до 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850) Оризиа	От 20 до 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Гупи	От 20 до 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (*Teleostei, Centrar-chidae*) (Rafinesque Linneaus 1758) Дребна сладководна риба	От 20 до 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (*Teleostei, Salmo-nidae*) (Walbaum 1988) Дъгова пъстърва	От 12 до 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Златна рибка	От 20 до 24	6,0 ± 2,0

Събиране

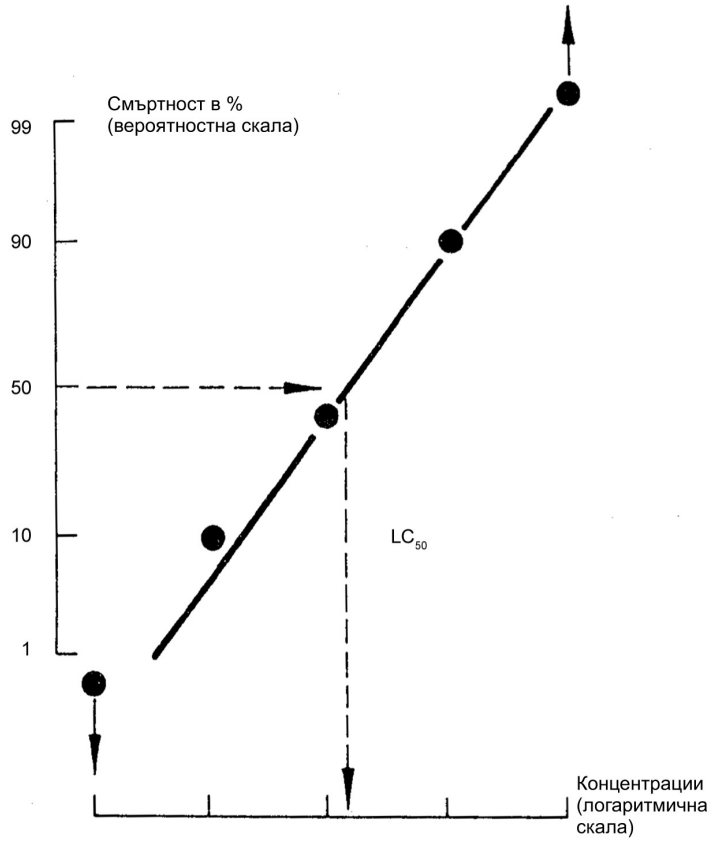
Изброените по-горе риби са лесни за отглеждане и/или лесни за намиране през цялата година. Те могат да се развъждат и култивират в рибни ферми или в лаборатория, при условия на контрол за болести и паразити, така че експерименталните животни да бъдат здрави и с известен произход. Тези риби се намират в много части на света.

▼B

Допълнение 3

Пример за зависимостта концентрация: процент смъртност

Пример за определяне на LC_{50}, използвайки логаритмични координати.



▼B

B.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:

EC_{50}: 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 EC_{50} на 48-ия час (вж. точка 1.2 за определенията). Определянето на EC_{50} 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. Полезна 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 B.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 EC_{50} 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 EC_{50} — 24 h на калиев дихромат ($K_2Cr_2O_7$) 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 имобилизарат 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); pH-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 пялото 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. pH следва да бъде в границите от 6 до 9. Твърдост между 40 и 250 mg/l (изразена като $CaCO_3$) 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 дехлрорирана 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 pH. Ако pH не остане в границите 6—9, може да се наложи провеждането на второ изпитване, при което pH на изходния разтвор се коригира, за да стане еднакъв с този на водата за разреждане преди добавянето на изпитваното вещество. Корекцията на pH 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 разтварящия 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 pH. 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 анормално поведение или такъв външен вид.

▼B

1.8.3. **Аналитични измервания**

Разтвореният кислород и pH 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). pH 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 пялото 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 ± 20 % от номиналната или първоначалната измерена концентрация през пялата продължителност на изпитването, то резултатите могат да се основат на номиналната или измерената първоначални 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 анормално 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 (pH, твърдост, съотношение Ca/Mg, съотношение Na/K, алкалност, проводимост и др.); състав на реконституираната вода, ако е използвана такава;

— инкубационни условия: температура, светлинен интензитет и периодичност, разтворен кислород, pH и др.

Резултати:

— броят и процентът на дафниите, които са имобилизирани или проявяват някакви неблагоприятни ефекти (включително анормално 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, pH и разтворен кислород, направени по време на изпитването;

— EC_{50} 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 EC_{50} (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

▼B

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 $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Магнезиев сулфат $MgSO_4$, $7H_2O$	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 $\mu S.cm^{-1}$. 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/1)	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000 пъти	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	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/1)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000 пъти	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000 пъти	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 пъти	1,0	0,25
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000 пъти	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000 пъти	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 пъти	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	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.$2H_2O$	5 000	2 000 пъти	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000 пъти	—	—

КактКакто Na 2 EDTA, така и $FeSO_4$ разтворите се приготвят поединично, събират се аедно и веднага се поставят в автоклав.

Това дава:

2 1 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)				
$CaCl_2.2H_20$	293 800	1 000 пъти	1,0	1,0
$MgSO_4.7H_2O$	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
$Na_2SiO_3.9H_2O$	50 000	5 000 пъти	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 пъти	0,1	0,1
KH_2PO_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 комбиниран витамин 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, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25—33.

▼M1

B.3. СЛАДКОВОДНИ ВОДОРАСЛИ И ЦИАНОБАКТЕРИИ, ИЗПИТВАНЕ ЗА ПОТИСКАНЕ НА РАСТЕЖА

1. МЕТОД

Този метод е еквивалентен на ОИСР TG 201 (2006) (1).

1.1. УВОД

Методите за изпитване периодично се преразглеждат и актуализират в контекста на научния напредък. Методът на изпитване C.3 трябваше да бъде преразгледан, за да се включат допълнителни видове и за да отговори на изискванията за оценяване на риска и класифициране на химикали. Преразглеждането беше извършено въз основа на обширен практически опит, научен напредък в сферата на изследванията за токсичност при водораслите и широкообхватна регулаторна употреба, която е налице след първоначалното приемане.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

За целите на настоящия метод на изпитване се използват следните определения и съкращения:

Биомаса: сухото тегло от жива материя, присъстваща в дадена популация, изразено посредством определен обем; например mg изпитван разтвор от водорасли/литър. 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 преброяването на клетки, флуоресценция и т.н., се измерват по принцип и следователно употребата на термина „биомаса“ се отнася и до измервания на тези сурогати.

Коефициент на вариация: безразмерна мярка на неравномерността на параметър, определена като съотношението между стандартното отклонение и средната стойност. Това също така може да бъде изразено като процентна стойност. Средният коефициент на вариация на средната специфична скорост на растеж в повторните проби 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 съответната повторна проба.

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 повторните проби от контролни култури.

ECx: концентрацията на изпитваното вещество, разтворено в изпитваната среда, което води до x % (например 50 %) намаляване на растежа на изпитвания организъм в рамките на даден период на експозиция (който трябва да бъде посочен изрично, ако се отклонява от пълната или нормалната продължителност на изпитването). За да се обозначи недвусмислено стойността на EC, получена от скоростта на растеж или от добива, се използват съответно символите „E_rC“ и „E_yC“.

Среда на растеж: напълно синтетичната културална среда, в която растат изпитваните водорасли, когато са изложени на изпитваното вещество. Изпитвано вещество обикновено ще бъде разтваряно в средата за изпитване.

Скорост на растеж (средна специфична скорост на растеж): логаритмичното нарастване на биомасата по време на периода на експозиция.

▼M1

Най-ниска концентрация на наблюдавано въздействие (LOEC) е най-ниската изпитвана концентрация, при която за веществото се наблюдава статистически значимо понижаващо въздействие върху растежа (при $p < 0,05$) в сравнение с контролната проба, в рамките на дадено време на експозиция. Въпреки това всички изпитвани концентрации, по-големи от LOEC, трябва да имат вредно въздействие, равно или по-голямо от наблюдаваното при LOEC. Когато тези две условия не могат да бъдат изпълнени, трябва да се даде пълно обяснение за това, как е избрана LOEC (и следователно NOEC).

Концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC): изпитваната концентрация непосредствено под LOEC.

Променлива на реакция: променлива за оценяване на токсичността, получена от измерваните параметри, описващи биомаса чрез различни методи на изчисление. За този метод скоростите на растеж и добив са променливи на реакция, получени от прякото измерване на биомаса или който и да е от посочените сурогати.

Специфична скорост на растеж: променлива на реакция, определена като частното на разликата на естествените логаритми на параметър на наблюдение (биомаса в настоящия метод за изпитване) и съответния период от време.

Добив: 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.

1.3. ПРИЛОЖИМОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

Настоящият метод за изпитване е най-лесно приложим към водоразтворими вещества, за които е вероятно при условията на изпитването да останат във водата. За изпитването на вещества, които са летливи, силно адсорбиращи, оцветени, със слаба водоразтворимост или вещества, които могат да повлияят на наличността на хранителни вещества или минерали в средата на изпитване, може да са нужни определени изменения на описаната процедура (например затворена система, предварителна обработка на съдовете за изпитване). Указания за някои подходящи изменения са дадени в (2), (3) и (4).

1.4. ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

Целта на настоящото изпитване е да се определят въздействията на дадено вещество върху растежа на сладководните микроводорасли и/или цианобактерии. Експоненциално растящите изпитвани организми са изложени на действието на изпитваното веществото в култури на партиди, обикновено за период от 72 часа. Въпреки относително кратката продължителност на изпитването могат да бъдат оценени въздействията върху няколко поколения.

Реакцията на системата е намаляване на растежа в серии култури от водорасли (изпитвани единици), изложени на действието на различни концентрации на изпитваното вещество. Реакцията се оценява като функция на концентрацията на експозиция в сравнение със средния растеж на повторни, неизложени на въздействие контролни култури. За пълното представяне на реакцията 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.

▼M1

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 преброяване на клетките. 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.

Крайната цел 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 поредица 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 (например E_rC_{50}).

За прилагането на настоящия метод съгласно регулаторната рамка на ЕС изчисляването на резултатите следва да се базира върху средната специфична скорост на растеж поради причините, описани в раздел 2.2 по-долу. Допълнителната променлива на реакция, използвана в настоящия метод на изпитване, е добивът, който може да е нужен за изпълнението на 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 редица от изпитвани разтвори, се изчислява концентрацията, при която се осъществява потискане на добива до определените x % (например 50 %) и се изразява като E_yC_x (например E_yC_{50}).

В допълнение най-ниската концентрация на наблюдавано въздействие (LOEC) и липсата на концентрация на наблюдавано въздействие (NOEC) могат да бъдат определени по статистически начин.

1.5. ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

Информацията за изпитваното вещество, 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, pKa и резултатите от изследванията на трансформация, включително биоразграждането във вода.

Разтворимостта във вода, коефициентът за разделяне октанол/-вода (P_{ow}) и парното налягане на изпитваното вещество трябва да са известни и да е на разположение валидиран метод за количествено измерване на веществото в изпитваните разтвори с отчетена ефективност на възстановяването и граница на откриването.

1.6. РЕФЕРЕНТНО ВЕЩЕСТВО

Референтното(ите) вещество(а), като например 3,5-дихлорфенол, използван в международното кръгово изпитване (4), може(гат) да бъде(ат) изпитвано(и) като средство за проверка на процедурата за изпитване. Калиевият дихромат също може да бъде използван като референтно вещество за зелените водорасли. Желателно е референтното вещество да се изпитва най-малко два пъти годишно.

1.7. ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

За да е валидно изпитването, трябва да бъдат изпълнени следните критерии за резултати:

▼M1

— Биомасата в контролните култури би трябвало да се е увеличила експоненциално с фактор най-малко 16 в рамките на 72-часовия период на изпитване. Това съответства на специфична скорост на растеж от 0,92 ден$^{-1}$. За най-често използваните видове скоростта на растеж обикновено е значително по-висока (вижте допълнение 1). Този критерий може да не бъде изпълнен, когато се използват видове, които растат по-бавно от тези, изброени в допълнение 1. 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 минималният фактор за умножение 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 (вижте раздел 1.2, „коефициент на вариация“) не трябва да превишава 35 %. Вижте втората алинея от раздел 2.2.1 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 бива да превишава 10 %.

1.8. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.8.1. **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. Предметите 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.

Съдовете за изпитване обикновено са стъклени колби с размери, които позволяват достатъчен обем на културата за измервания по време на изпитването и достатъчен пренос на маса от CO_2 от атмосферата (вижте втората алинея от раздел 1.8.9). Отбележете, че обемът на течността трябва да бъде достатъчен за аналитични изчисления (вижте петата алинея от раздел 1.8.11).

В допълнение ще се изискват някои или всички от следните уреди:

— Апаратура за култивиране: препоръчва се шкаф или камера, в който/която избраната инкубационна температура да може да бъде поддържана при ± 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), ще 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).

▼M1

— 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.

1.8.2. **Изпитвани организми**

Могат да се използват няколко вида неприкрепени микроводорасли и цианобактерии. Щамовете, изброени в допълнение 1, са демонстрирани като подходящи при използването на процедурата на изпитване, определена в настоящия метод на изпитване.

Ако се използват други видове, следва да се докладва 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.

1.8.3. **Среда на растеж**

Препоръчват се две алтернативни среди на растеж, средите на ОИСР и на ААР. Съставът на тези среди е показан в допълнение 2. Отбележете, че първоначалната стойност на pH и буферната способност (регулираща увеличаването на pH) на двете среди са различни. Следователно резултатите от изпитванията могат да бъдат различни в зависимост от използваната среда, особено когато се изпитват йонизиращи вещества.

Може да е необходимо изменение на средата на растеж за определени цели, например когато се изпитват метали или хелатни агенти или за изпитване при различни стойности на pH. Използването на изменена среда трябва да бъде подробно описано и обосновано (3)(4).

1.8.4. **Начална концентрация на биомасата**

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	5×10^3-10^4	клетки/ml
Desmodesmus subspicatus	2-5 x 10^3	клетки/ml
Navicula pelliculosa	10^4	клетки/ml
Anabaena flos-aquae	10^4	клетки/ml
Synechococcus leopoliensis	5×10^4-10^5	клетки/ml

1.8.5. **Концентрации на изпитваното вещество**

Диапазонът на концентрация, в който е възможно да настъпят въздействия, може да бъде определен на базата на резултати от изпитвания за откриване на диапазон. За крайното определящо изпитване трябва да се изберат поне пет концентрации, подредени в геометрична поредица с фактор, който не превишава 3,2. За изпитвани вещества, показващи полегата крива на реагиране на концентрация, може да бъде обоснован и по-висок фактор. Поредицата от концентрации трябва по възможност да обхваща диапазона, при който се постига 5—75 % потискане на скоростта на растеж на водораслите.

▼M1

1.8.6. **Повторни проби и контролни проби**

Планът на изпитването следва да включва три повторни проби 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 повторните проби за всяка концентрация. Броят на контролните повторни проби трябва да бъде поне три и в най-добрия случай следва да бъде два пъти повече от броя на повторните проби, използвани за всяка една изпитвана концентрация.

Може да бъде приготвен отделен набор от изпитвани разтвори за аналитично определяне на концентрациите на изпитваното вещество (вижте четвърта и шеста алинея от раздел 1.8.11).

Когато се използва разтворител, за да се направи разтворимо изпитваното вещество, в плана на изпитването трябва да бъдат включени допълнителни контролни проби, съдържащи разтворителя в същата концентрация, каквато е използвана в изпитваните култури.

1.8.7. **Подготвяне на инокулант**

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. Измерете увеличаването на биомасата в инокуланта, за да гарантирате, че растежът е в рамките на нормалния диапазон за изпитвания щам при условията за култивиране. В допълнение 3 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.

1.8.8. **Приготвяне на изпитваните разтвори**

Всички разтвори за изпитване трябва да съдържат еднакви концентрации на средата на растеж и началната биомаса на изпитваните водорасли. Изпитваните разтвори на избраните концентрации обикновено се приготвят чрез смесване на стандартен разтвор на изпитваното вещество със средата на растеж и инокуланта. Стандартните разтвори обикновено се приготвят чрез разтваряне на веществото в изпитваната среда.

Разтворители, като например ацетон, терт-бутилов алкохол и диметилформамид, могат да се използват като носители за добавяне на вещества със слаба водоразтворимост към изпитваната среда (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.

1.8.9. **Инкубация**

Запушете съдовете за изпитване 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 CO_2. За тази цел следва да се осъществява постоянно разклащане или разбъркване. Културите следва да бъдат поддържани при температура в диапазона от 21 до 24 °C, регулирана с отклонение от ± 2 °C. За видовете, различни от посочените в допълнение 1, 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.

▼M1

pH на контролната среда не би трябвало да се увеличава с повече от 1,5 единици по време на изпитването. За метали и смеси, които частично се йонизират при стойности на pH около стойността на pH при изпитването, може да е нужно ограничаване на отклонението на pH, за да се получат възпроизводими и добре дефинирани резултати. Отклонение < 0,5 pH единици е технически осъществимо и може да бъде постигнато с осигуряване на адекватен процент на пренос на маса от CO_2 от заобикалящия въздух към изпитвания разтвор, например чрез увеличаване на честотата на разклащане. Друга възможност е да се намали потребността от CO_2 чрез намаляване на първоначалната биомаса или продължителността на изпитването.

Повърхността, където се инкубират културите, следва да получава непрекъсната хомогенна флуоресцентна светлина, например от вида „студена бяла светлина“ или „дневна светлина“. Щамовете от водорасли и цианобактерии се различават в 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 на 60—120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, когато се измерва в диапазона на фотосинтетичната ефективна дължина на вълната от 400—700 nm с използването на подходящ рецептор. Някои видове, по-специално *Anabaena flos-aquae*, растат добре при ниски интензитети на светлина и могат да бъдат увредени при високи интензитет. За такива видове следва да се избере среден интензитет на светлината в диапазона 40—60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (За уреди за измерване на светлината, калибрирани в луксове, еквивалентният диапазон от 4 440—8 880 lux за студена бяла светлина съответства приблизително на препоръчвания интензитет на светлината от 60—120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). Интензитетът на светлината не се отклонява с повече от ± 15 % от средния интензитет на светлината върху инкубационната площ.

1.8.10. **Продължителност на изпитването**

Продължителността на изпитването обикновено е 72 часа. Въпреки това може да се използва по-кратка или по-дълга продължителност на изпитванията, при условие че са спазени всички критерии за валидност в раздел 1.7.

1.8.11. **Измервания и аналитични определения**

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 разтвора с пипета, те не бива да се връщат обратно.

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 биомаса). Могат да се използват алтернативни техники, например поточна цитометрия, *in vitro* или *in vivo* хлорофилна флуоресценция (6)(7) или оптична плътност, при условие че може да бъде демонстрирана задоволителна корелация с биомасата в диапазона на биомасата, която се явява по време на изпитването.

Стойността на pH на разтворите се измерва в началото и в края на изпитването.

При условие че е налице аналитична процедура за определяне на изпитваното вещество 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.

▼M1

Анализът на концентрацията на изпитваното вещество в началото и 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 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 вещества 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 изпитвано вещество. За тези вещества ще са необходими допълнителни повторни проби. Във всички случаи определянето на концентрациите на изпитваното вещество трябва да бъде извършвано само в един съд с повторна проба при всяка една изпитвана концентрация (или в съдържанието на съдовете, групирани от повторна проба).

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. те трябва да бъдат инокулирани с водорасли и инкубирани при еднакви условия. Ако се изисква анализ на концентрацията на разтвореното изпитвано вещество, 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.

Ако има доказателство, че концентрацията на веществото, което се изпитва, е била задоволително поддържана в рамките на ± 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 е по-голямо от ± 20 %, анализът на резултатите следва да се основава на средната геометрична концентрация по време на експозиция или на модели, описващи намаляването на концентрацията на изпитваното вещество (3)(8).

Изпитването за потискане на растежа на водораслите е по-динамична система за изпитване от повечето други краткосрочни изпитвания за водна токсичност. Като следствие може да е трудно да се определят действителните концентрации на експозиции, особено за адсорбиращи вещества, изпитвани при ниски концентрации. В такива случаи изчезването на веществото от разтвор чрез адсорбция към увеличаващата се биомаса от водорасли не означава, че то е изгубено от системата за изпитване. Когато се анализира резултатът на изпитването, следва да се провери дали намаляването на концентрацията на изпитваното вещество 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 изпитваното вещество (8). В противен случай може да е подходящо анализът да се базира на резултатите от първоначалните (номинални или измерени) концентрации.

1.8.12. **Други наблюдения**

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 промени във външния вид на водораслите (които могат да бъдат причинени от експозицията на въздействието на изпитваното вещество) в края на изпитването.

▼M1

1.8.13. **Гранично изпитване**

При определени условия, например когато предварителното изпитване показва, че изпитваното вещество няма токсични въздействия при концентрации до 100 $mg \cdot l^{-1}$ 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 реакциите в контролна група и една от третираните групи (100 $mg \cdot l^{-1}$ или концентрация, равна на границата на разтворимост). Настоятелно се препоръчва това да бъде подкрепено от анализ на концентрацията на експозиция. Всички предишни описани условия на изпитване и критерии за валидност се прилагат към граничното изпитване, с изключение на това, че броят на третираните повторни проби трябва да бъде най-малко шест. Променливите на реакция в контролната и третираната група могат да бъдат анализирани с използването на статистически тест, за да се сравнят средните стойности, например t-тест на Student. Ако променливостта на двете групи не е еднаква, трябва да бъде извършен t-тест, предназначен за различни видове променливост.

1.8.14. **Изменение за силно оцветените вещества**

Ирадиацията (интензитетът на светлината) трябва да бъде в най-високия край на диапазона, предписан в настоящия метод за изпитване: 120 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ или по-висока.

Светлинният път трябва да бъде скъсен посредством намаляване на обема на изпитваните разтвори (в диапазона 5—25 ml).

Трябва да се приложи достатъчно раздвижване (например посредством умерено разклащане), за да се получи висока честота на експозиция на водораслите на висока ирадиация на повърхността на културата.

2. **ДАННИ**

2.1. ПОСТРОЯВАНЕ НА КРИВИ НА РАСТЕЖА

Биомасата в съдовете за изпитване може да се изрази в единици на сурогатния параметър, използван за измерване (например брой клетки, флуоресценция).

Табулирайте 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 начертаете 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. Отбележете, 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.

Като използвате графиките, проверете дали контролните култури растат експоненциално с очакваната скорост през цялото изпитване. Разгледайте внимателно всички точки с данни и вида на графиките и проверете необработените данни и процедурите за евентуални грешки. По-специално проверете точките с данни, за които изглежда, че се отклоняват поради системна грешка. Ако е очевидно, че могат да се установят и/или предположат процедурни грешки с голяма вероятност, специфичната точка с данни се маркира като отклонение и не се включва в последващия статистически анализ. (Нулева концентрация на водорасли в един от двата или трите съда с повторни проби може да е индикация, че съдът не е инокулиран правилно или не е бил почистен добре). Причините за отхвърлянето на точка с данни като отклонение трябва да се формулират ясно в протокола от изпитването. Приемливите причини са само (редки) грешки в процедурата, а не просто недостатъчно добра точност. Статистическите процедури за идентифициране на отклонения имат ограничено използване за този тип проблем и не могат да заменят експертната преценка. Препоръчително е точките с отклонения (маркирани като такива) да се запазят между точките с данни, показани в последващите графични или таблични представяния на данни.

▼M1

2.2. ПРОМЕНЛИВИ НА РЕАКЦИЯ

Целта на изпитването е да се определят въздействията на изпитваното вещество върху растежа на водораслите. Настоящият метод на изпитване описва две променливи на реакция, тъй като държавите-членки имат различни предпочитания и регулаторни нужди. За да се приемат резултатите от изпитването във всички държави-членки, въздействията следва да се оценяват, като се използват и двете променливи на реакция а) и б), описани по-долу.

а) Средна специфична скорост на растеж: тази променлива на реакция се изчислява на базата на логаритмичното нарастване на биомасата през периода на изпитването, изразено за ден.

б) Добив: тази променлива на реакция представлява биомасата в края на изпитването минус началната биомаса.

За прилагането на настоящия метод съгласно регулаторната рамка на ЕС изчисляването на резултатите следва да се базира върху средната специфична скорост на растеж поради причините, описани по-долу. Би трябвало да се отбележи, че стойностите на токсичността, изчислени с използването на тези две променливи на реакция, 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_rC_x), в общия случай ще са по-високи от резултатите, базирани на добива (E_yC_x), ако се придържате към условията за изпитване на настоящия метод за изпитване поради математическата база на съответните подходи. Това не бива да се тълкува като разлика в чувствителността между двете променливи на реакция, просто двете стойности са математически различни. 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 въздействията върху скоростта на растежа, без да зависи от абсолютното ниво на специфичната скорост на растеж на контролната проба, от наклона на кривата на реакция на концентрация или от продължителността на изпитването. Противоположно на това резултатите, базирани на добива, зависят от всички тези други променливи. E_yC_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 променлива на реакция 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 оценка на токсичността се предпочита от научна гледна точка, оценките на токсичността, базирани на добива, също са включени в настоящия метод на изпитване, така че да бъдат удовлетворени действащите регулаторни изисквания в някои държави.

2.2.1. **Средна скорост на растеж**

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 третирани проби:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \quad (\text{ден}^{-1})$$

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.

▼M1

Изчислете средната стойност за скоростта на растеж заедно с оценки на променливостта за всяка група третирани проби и контролна група.

Изчислете средната специфична скорост на растеж в течение на целия период на изпитването (обикновено 0—3 дни) с използване на първоначално инокулираната биомаса като начална стойност, а не измерената начална стойност, защото по този начин обикновено се получава по-голяма точност. Ако оборудването, което се използва за измерване на биомасата, позволява достатъчно точно определяне на малката биомаса на инокулума (например поточен цитометър), тогава може да се използва концентрацията на началната биомаса. Освен това оценете 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 проверете дали скоростта на растеж на контролната проба остава постоянна (вижте критериите за валидност, раздел 1.7). 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 изпитвано вещество (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 изпитваното вещество, които възникват при процеса на експозиция. Наличието на съществени разлики между скоростта на растеж по сектори и средната скорост на растеж показва, че има отклонение от постоянния експоненциален растеж и има основание за внимателна проверка на кривите на растежа.

Процентното потискане на скоростта на растежа за всяка третирана повторна проба се изчислява от уравнението:

$$\% I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

където:

$\% I_r$: процентно потискане на 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 третираната повторна проба.

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.

2.2.2. **Добив**

Добивът се изчислява като биомасата в края на изпитването минус началната биомаса за всеки отделен съд с контролни проби и с третирани проби. За всяка изпитвана концентрация и контролна проба следва да се изчисли средната стойност на добива заедно с оценки на променливостта. Процентното потискане на добива ($\%I_y$) може да се изчисли за всяка третирана повторна проба, както следва:

$$\% I_y = \frac{(Y_C - Y_T)}{Y_C} \times 100$$

▼M1

където:

% I_y: процентно потискане на добива;

Y_C: средна стойност за добива в контролната група;

Y_T: стойност на добива в третираната повторна проба.

2.3. ПОСТРОЯВАНЕ НА КРИВАТА НА РЕАКЦИЯ НА КОНЦЕНТРАЦИЯ

Нанесете процента на потискане като функция на логаритъма на концентрацията на изпитваното вещество и внимателно проверете графиката, като не отчитате точките с данни, които са изолирани като отклонения в първата фаза. Прекарайте гладка линия през точките с данни на око или чрез компютърна интерполация, за да получите първо впечатление от съотношението между концентрацията и реакцията, а след това продължете, като приложите по-подробен метод, за предпочитане някой компютризиран статистически метод. В зависимост от предполагаемото използване на данните, качеството (точност) 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 (вижте също раздела по-долу относно стимулираните въздействия). Обосноваите 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 тези, които могат да се получат чрез експертна оценка — в такива ситуации някои компютърни програми може дори да не дадат надеждно решение (повторенията може да не съвпадат и др.),

— реакциите на стимулиран растеж не могат да се обработят адекватно с използване на наличните компютърни програми (вижте по-долу).

2.4. СТАТИСТИЧЕСКИ ПРОЦЕДУРИ

Целта е да се получи количествено съотношение на реакция на концентрация чрез регресионен анализ. Може да се използва тегловна линейна регресия след извършване на преобразуване на данните от ответната реакция в линейни — например в единици пробит или логит или Weibull (9), но предпочитаните техники са процедурите на нелинейна регресия, които по-добре обработват неизбежните неравномерности в данните и отклоненията от гладките разпределения. При приближаването на нулево или пълно потискане подобни неравномерности може да бъдат увеличени от преобразуването, като по този начин пречат на анализа (9). Следва да се отбележи, че стандартните методи на анализ с помощта на преобразувания на пробит, логит или Weibull са предназначени за използване с дискретни данни (например смъртност или оцеляване) и трябва да бъдат изменени, за да се приспособят към данните за растежа или биомасата. Специфичните процедури за определяне на стойностите на EC_x от непрекъснати данни могат да се намерят в (10)(11) и (12). Използването на нелинеен регресионен анализ е допълнително описано в допълнение 4.

▼M1

За анализа на всяка от променливите на реакция използвайте съотношението на реакция на концентрация за да изчислите точковите оценки за стойностите на EC_x. Когато е възможно, следва да се определят 95 % доверителни граници за всяка прогноза. Степента на съответствие на данните от реакцията и регресионния модел следва да се оцени графично или статистически. Регресионният анализ следва да се извърши като се използват реакциите на отделните повторни проби, а не средните стойности на група от третирани проби. Ако обаче налагането на нелинейна крива е трудно или несполучливо поради твърде голямото разсейване в данните, проблемът може да се заобиколи чрез извършване на регресия върху средните стойности на група като практичен начин за намаляване на влиянието на точки, за които има съмнения, че се отклоняват твърде много. Използването на тази възможност следва да се отбележи в протокола от изпитването като отклонение от нормалната процедура, тъй като нанасянето на отделните повторни проби на кривата не е дало добър резултат.

Оценките на EC_{50} и доверителните граници могат да се получат и чрез използване на линейна интерполация с оценка на извадковата грешка (13), ако наличните регресионни модели/-методи не са подходящи за данните.

За оценяването на LOEC и следователно на NOEC и за въздействието на изпитваното вещество върху скоростта на растеж е необходимо да се сравнят средните стойности на третирана проба като се използват техниките за анализ на дисперсията (ANOVA). След това средната стойност за всяка концентрация трябва да се сравни със средната стойност на контролна проба с помощта на подходящ метод за многократно сравняване или метод за тестване на тенденция. Тестът на Dunnett или William може да е удобен (14)(15)(16)(17)(18). Необходимо е да се оцени дали е в сила предположението в ANOVA за хомогенност на променливостта. Тази оценка може да се извърши графично или чрез формален тест (18). Подходящи са тестовете на Levene или Bartlett. Невярното предположение за хомогенност на променливостта понякога може да се коригира чрез логаритмично преобразуване на данните. Ако хетерогенността на променливостта е много голяма и не може да се коригира чрез преобразувания, следва да се обмисли анализ с методи като низходящите тестове на Jonkheere за тенденции. Допълнителни указания относно определянето на NOEC могат да се намерят в (12).

Последните научни разработки доведоха до препоръката концепцията за NOEC да бъде премахната и заменена с точкови оценки на ECx, базирани на регресия. 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 променлива на реакция) и е по-добре да бъдат отчетени и двете стойности EC_{10} и EC_{20}.

2.5. СТИМУЛИРАНЕ НА РАСТЕЖА

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. Отбележете, 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 с ниска доза може да се пренебрегне при изчисляването на EC_{50}, освен ако не е много крайна. При все това, ако е крайна или ако трябва да се изчисли стойността на EC_x за ниско x, може да са необходими специални процедури. Ако е възможно, следва да се избягва заличаване на реакциите при стимулиране от анализа на данните, а ако наличният софтуер за нанасяне на криви не може да приеме незначителна стимулация, би могло да се използва линейна интерполация с оценка на извадковата грешка. Ако стимулацията е крайна, може да се обмисли използване на хормезен модел (19).

▼**M1**

2.6. НЕТОКСИЧНО ПОТИСКАНЕ НА РАСТЕЖА

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, а първите следва да се отчитат отделно. Насоки могат да се намерят в (2) и (3).

3. **ОТЧИТАНЕ**

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването трябва да включва следното:

Изпитвано вещество:

— физическо естество и съответни физикохимични свойства, включително граница на водоразтворимост,

— данни за химичната идентификация, включително чистота.

Изпитвани видове:

— щам, доставчик или източник и използваните условия за културата.

Условия на изпитването:

— дата на началото на изпитването и неговата продължителност,

— описание на схемата на изпитването: съдове за изпитването, обеми на културите, плътност на биомасата в началото на изпитването,

— състав на средата,

— изпитвани концентрации и повторни проби (например брой на повторните проби, 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: номинални тествани концентрации и всички резултати от анализи за определяне на концентрацията на изпитваното вещество в съдовете за изпитване. Следва да се отчете ефективността за възстановяване на метода и границата на количествената оценка в тестовата матрица,

— всички отклонения от настоящия метод на изпитване,

— метод за определянето на биомасата и доказателство за корелация между измерения параметър и сухото тегло.

Резултати:

— стойности на pH в началото и края на изпитването при всички третирани проби,

— биомасата за всяка колба при всяка точка на измерване и метод за измерване на биомасата,

▼**M1**

— криви на растеж (графика на биомасата в зависимост от времето),

— изчислените променливи на реакция за всяка третирана повторна проба със средни стойности и коефициент на вариациите за повторните проби,

— графично представяне на съотношението концентрация/-ефект,

— оценки на токсичността за променливите на реакция, например EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} и свързаните доверителни интервали. Ако са изчислени — LOEC и NOEC, както и статистическия метод 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 всяко влияние върху резултата от изпитването, появило се поради отклонения от настоящия метод на изпитване.

4. **ЛИТЕРАТУРА**

(1) OECD TG 201 (2006) Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test

(2) ISO 1998: Water quality — Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442

(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.

(4) ISO 1998: Water quality — Sampling — Part 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667—16.

(5) ISO 1993: Water quality — Algal growth inhibition test. ISO 8692

(6) 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.

(7) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22,5 (1977), pp.919—925

(8) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. Environ. Toxicol. Chem 22, 2073—2079.

(9) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713—718.

▼**M1**

(10) 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.

(11) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Env. Toxicol. Chem. 11:1485—1494.

(12) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(13) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05—88. USEPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096—1121

(15) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482—491.

(16) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103—117.

(17) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510—531.

(18) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93—96.

▼M1

Допълнение 1

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, Amblerside

Cumbria

LA22 0LP

UK

SAG: Collection of Algal Cultures

Inst. Plant Physiology

University of Göttingen

Nicholausberger Weg 18

D-37073 Göttingen

GERMANY

UTEX Culture Collection of Algae

Sector of Molecular, Cellular and Developmental Biology

School of Biological Sciences

The University of Texas at Austin

Austin, Texas 78712

USA

▼M1

Външен вид и характеристики на препоръчваните видове

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Външен вид	Извити, усукани едноклетъчни	Овални, повечето едноклетъчни	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)	$2—3 \times 10^{-8}$	$3—4 \times 10^{-8}$	$3—4 \times 10^{-8}$	$1—2 \times 10^{-8}$	$2—3 \times 10^{-9}$
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 ОИСР при интензитет на светлината приблизително 70 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 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. Информация относно подходящите среди е на разположение 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 растеж за запазване на изходната култура. Особено важно е да се избягва възможността партидна култура да прескочи логаритмичната фаза на растеж при обновяване; възстановяването на този етап е трудно.

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 обработване с ултразвук на подпробите за прекъсване на веригите, за да се намалят разминаванията при преброяването. По-дългата обработка с ултразвук от необходимата за накъсването на веригите за да станат те с по-малка дължина, може да разруши клетките. Интензивността на обработката с ултразвук и нейната продължителност трябва да са идентични за всяка третирана проба.

Пребройте достатъчно полета върху хемоцитометъра (най-малко 400 клетки), за компенсиране на разминаванията. 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 обработка с ултразвук. Енергията на ултразвука при обработката трябва да се регулира, за да се избегне разрушаването на клетките.

Използвайте вихров миксер или подобен подходящ метод, за да сте сигурни, че суспензията на водорасли, използвана за инокулиране на съдовете за изпитване, е добре разбъркана и хомогенна.

▼**M1**

Съдовете за изпитване следва да се поставят върху въртящ се кръгово или възвратно-постъпателен шутел-апарат при около 150 оборота в минута. Алтернативно може да се използва непрекъснато 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 за отглеждане 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 броенето с микроскоп за измервания на биомасата. От полза са електронни броячи на частици, оборудвани за броене на частици до размери от приблизително 1 μm. Флуоресцентните измервания *in vitro* също са приложими.

Navicula pelliculosa

Може да се използват различни среди за отглеждане 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 повърхностен слой. При такива обстоятелства трябва да се предприемат специални мерки, когато се вземат подпроби за определяне на биомасата, за да се вземат представителни проби. Може да е нужно енергично разбъркване, например с използване на вихров миксер.

▼**M1**

Допълнение 2

Среда на растеж

Може да се използва една от следните две среди на растеж:

Среда ОИСР: оригиналната среда на ОИСР TG 201, също съгласно ISO 8692

US. EPA среда на AAP, също съгласно ASTM.

При приготвянето на тези среди следва да се използват реактив или химикал с високоаналитични качества и дейонизирана вода.

Състав на средата на AAP (US. EPA) и на средата на ОИСР TG 201

Компонент	EPA		ОИСР	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2 \cdot 2(H_2O)$	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 образуването на комплекси от йони на тежки метали.

При изпитването с диатомеята *Navicula pelliculosa* и към двете среди трябва да се добави $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ за получаване на концентрация от 1,4 mg Si/l.

Стойността на pH се получава при равновесие между карбонатната система на средата и парциалното налягане на CO_2 в атмосферния въздух. Приблизителното съотношение между pH при 25 °C и моларната концентрация на бикарбонатната система е:

$$pH_{eq} = 11{,}30 + \log [HCO_3]$$

▼**M1**

С 15 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 7,5 (среда на US. EPA), а с 50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8,1 (среда на ОИСР).

Елементен състав на изпитваните среди

Елемент	EPA	ОИСР
	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 ОИСР

Хранително вещество	Концентрация в изходния разтвор
Изходен разтвор 1: макронутриенти	
NH_4Cl	1,5 $g \cdot l^{-1}$
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 $g \cdot l^{-1}$
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 $g \cdot l^{-1}$
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 $g \cdot l^{-1}$
KH_2PO_4	0,16 $g \cdot l^{-1}$
Изходен разтвор 2: желязо	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 $mg \cdot l^{-1}$
Изходен разтвор 3: микроелементи	
H_3BO_3	185 $mg \cdot l^{-1}$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 $mg \cdot l^{-1}$
$ZnCl_2$	3 $mg \cdot l^{-1}$
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 $mg \cdot l^{-1}$
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 $mg \cdot l^{-1}$
Изходен разтвор 4: бикарбонат	
$NaHCO_3$	50 $g \cdot l^{-1}$
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Стерилизирайте изходните разтвори с мембранно филтриране (среден диаметър на порите 0,2 μm) или чрез обработка в автоклав (120 °C, 15 минути). Съхранявайте разтворите на тъмно при 4 °C.

Не обработвайте изходни разтвори 2 и 4 в автоклав, а ги стерилизирайте с мембранно филтриране.

▼**M1**

Пригответе средата на растеж чрез добавяне на съответния обем изходен разтвор от 1 до 4 към вода:

Добавете до 500 ml стерилизирана вода:

— 10 ml от изходен разтвор 1

— 1 ml от изходен разтвор 2

— 1 ml от изходен разтвор 3

— 1 ml от изходен разтвор 4

Допълнете до 1 000 ml със стерилизирана вода

Оставете достатъчно време за постигане на равновесие на средата с атмосферния CO_2, при необходимост чрез барботиране със стерилен филтриран въздух в течение на няколко часа.

Приготвяне на средата на AAP

A1.1. Добавете 1 mL от всеки изходен разтвор в A1.2.1 — A1.2.7 към приблизително 900 mL дейонизирана или дестилирана вода и след това разредете до 1 L.

A1.2. Изходните разтвори с макронутриенти се правят чрез разтварянето на следните съставки в 500 mL дейонизирана или дестилирана вода. Реактивите A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 и A1.2.4 могат да се комбинират в един изходен разтвор.

A1.2.1. $NaNO_3$ -12,750 g.

A1.2.2. $MgCL_2 \cdot 6H_2O$ -6,082 g.

A1.2.3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ -2,205 g.

A1.2.4. *Изходен разтвор с микронутриенти* — (вижте A1.3).

A1.2.5. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -7,350 g.

A1.2.6. K_2HPO_4 -0,522 g.

A1.2.7. $NaHCO_3$ -7,500 g.

A1.2.8. $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ — вижте забележка A1.1.

Забележка A1.1 — Използвайте само видове диатомеи за тестване. 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.

A1.3. Изходният разтвор с микронутриенти се прави чрез разтваряне на следните съставки в 500 mL дейонизирана или дестилирана вода:

A1.3.1. H_3BO_3 -92,760 mg.

A1.3.2. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ -207,690 mg.

A1.3.3. $ZnCl_2$ -1,635 mg.

A1.3.4. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ -79,880 mg.

A1.3.5. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ -0,714 mg.

A1.3.6. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ -3,630 mg.

A1.3.7. $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ -0,006 mg.

A1.3.8. $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ -150,000 mg.

[Динатриев (етилендинитрило) тетраацетат].

▼**M1**

A1.3.9. $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$ -0,005 mg Вижте забележка A1.2.

Забележка A1.2 — Използвайте само в среда за изходни култури на вида диатомея.

A1.4. Регулирайте pH до 7,5 ± 0,1 с 0,1 N или 1,0 N NaOH или HCl.

A1.5. Филтрирайте средите 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 използвате брояч на частици.

A1.6. Съхранявайте средата на тъмно при приблизително 4 °C до влизане в употреба.

▼M1

Допълнение 3

Пример на 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. Желателни са култури с отсъствие на чужди организми, 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

Вижте в метод на изпитване: апаратура.

Процедури за получаване на култури на водорасли

Приготвяне на хранителни разтвори (среди):

Всички хранителни соли на средата се приготвят като концентрирани изходни разтвори и се съхраняват на тъмно и хладно. Тези разтвори се стерилизират чрез филтриране или обработка в автоклав.

Средата се приготвя чрез добавяне на правилното 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 тръбички 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 (обем около 100 ml). Когато водораслите се инкубират при 20 °C при непрекъснато осветяване е необходимо преместване веднъж седмично.

При преместването 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, е възможно 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.

▼M1

Допълнение 4

Анализ на данните чрез нелинейна регресия

Общи съображения

Реакцията при изпитването на водорасли и други микробиални изпитвания на растеж — растеж на биомаса — по своя характер е непрекъсната или метрична променлива — скоростта на процеса, ако се използва скоростта на растеж и нейният интеграл във времето, ако е избрана биомасата. И двете се отнасят към съответната средна реакция на неекспонирани повторни контролни проби, които дават максимална реакция 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 постоянен параметър, без да се вземат предвид отделните клетки. Разпределението на променливостта на типа реакция за такава система е свързано единствено с експериментални фактори (типично описвани чрез нормален логаритъм или нормално разпределение на грешки). Това е противоположно на типичните реакции на биологичния тест с количествени данни, за които допустимото отклонение (обикновено с биномно разпределение) на отделните организми често се приема за доминиращата компонента на променливостта. Реакциите на контролните проби тук са нулево или фоново ниво.

В неусложнените ситуации нормализираната или относителната реакция, r, намалява монотонно от 1 (нулево потискане) до 0 (100-процентно потискане). Отбележете, че за всички реакции е налице съответстваща грешка и че очевидно отрицателни потискания могат да се изчисляват като резултат от случайна грешка.

Регресионен анализ

Модели

Регресионният анализ има за цел да опише количествено кривата концентрация—реакция 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 числата за EC_x, включително EC_{50}, EC_{10} и EC_{20}, както и техните 95 % доверителни граници. Доказано е, че няколко прости математически функционални форми успешно описват съотношението концентрация— реакция, получено при изпитванията за потискане растежа на водорасли. Функциите включват например логистичното уравнение, несиметричното уравнение на Weibull и функцията на разпределението на нормалния логаритъм, всички от които са сигмоидални криви, асимптотично клонящи към единица за $C \rightarrow 0$ и към нула за $C \rightarrow$ безкрайност.

Използването на модели с непрекъсната прагова функция (например моделът на Koyman „за потискане на растежа на популация“ — Kooijman 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, EC0+, който се оценява чрез екстраполация на съотношението концентрация— реакция до пресичането с оста на концентрацията с помощта на проста непрекъсната функция, която не е разграничима в началната точка.

Обърнете внимание, че анализът може да бъде просто минимизиране на суми от остатъчни квадрати (като се приема постоянна променливост) или претеглените квадрати, ако хетерогенността на променливостта е компенсирана

▼M1

Процедура

Процедурата може да се опише както следва: изберете подходящо функционално уравнение, Y = f (C) и го съгласувайте с данните чрез нелинейна регресия. За предпочитане е да използвате измерванията от всяка отделна колба, а не средните стойности на повторните проби, за да извлечете колкото е възможно повече информация от данните. От друга страна, ако променливостта е голяма, практическият опит предполага, че средните стойности на повторните проби могат да доведат до по-устойчива математическа оценка, по-слабо повлияна от произволните грешки в данните, отколкото при запазването на всяка отделна точка с данни.

Постройте описващата крива и измерените данни и проверете дали налагането на кривата е подходящо. Анализът на остатъчни вещества може да е особено полезен инструмент за тази цел. Ако избраното функционално съотношение за налагане на реакцията на концентрация не описва добре цялата крива или съществена част от нея, като например реакцията при ниски концентрации, изберете друга възможност за налагане на кривата — например несиметрична крива като функцията на Weibull вместо симетрична. Отрицателните потискания могат да представляват проблем, например с функцията на разпределение на нормалния логаритъм, което също изисква алтернативна функция на регресия. Не се препоръчва да се обозначава с нула или малка положителна стойност на такива отрицателни стойности, защото това изкривява разпределението на грешките. Може да е подходящо да правите отделни налагания на частите от кривата като например частта на слабо потискане, за да оцените стойностите за $EC_{low\ x}$. Изчислете от описващото уравнение (чрез „обратно изчисление“, $C = f^{-1}(Y)$), оценките на характерните точки на EC_x и отчетете като минимум оценките за EC_{50} и една или две за $EC_{low\ x}$. Опитът от практическите изпитвания е показал, че точността 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. Точността на оценката за EC_{20} често е значително по-добра от тази на EC_{10}, защото EC_{20} обикновено е разположена на приблизително линейната част на централната крива на реакция на концентрация. Понякога може да е трудно да се тълкува EC_{10} поради стимулирането на растежа. Така че докато EC_{10} обикновено се получава с достатъчна точност, препоръчително е да се отчита винаги и EC_{20}.

Тегловни фактори

Експерименталната променливост в общия случай не е постоянна и типично включва пропорционална компонента, следователно има благоприятни условия за рутинно извършване на тегловна регресия. При такъв анализ обикновено се приема, че тегловните фактори са обратнопропорционални на променливостта:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Много програми за регресия имат възможност за анализ на тегловна регресия с тегловни фактори, изброени в таблица. За удобство, тегловните фактори следва да се нормализират, като се умножат с $n/\sum w_i$ (n е броят на точките с данни), така че тяхната сума да е равна на единица.

Нормализиране на реакциите

Нормализирането чрез средните стойности на реакциите от контролните проби създава някои принципни проблеми и води до получаване на твърде усложнена структура на променливост. Когато реакциите се разделят на средната стойност на реакцията на контролната проба, за да се получи процентът на потискане, се внася допълнителна грешка, предизвикана от грешката в средната стойност на контролната проба. Освен ако тази грешка не е пренебрежимо малка, тегловните фактори за регресията и доверителните граници трябва да бъдат коригирани от ковариацията с контролната проба (17). Трябва да се има предвид, че високата точност на изчислената средна стойност за реакцията на контролната проба е важна при свеждането до минимум на цялостната променливост за относителната реакция. Тази променливост е следната:

▼M1

индексът i се отнася до нивото i на концентрацията, а индексът 0 — за контролните проби)

$$Y_i = \text{относителна реакция} = r_i/r_0 = 1 — I = f\,(C_i)$$

с променливост:

$$\text{Var}\,(Y_i) = \text{Var}\,(r_i/r_0) \approx (\partial\, Y_i\,/\,\partial\, r_i)^2 \cdot \text{Var}\,(r_i) + (\partial\, Y_i/\,\partial\, r_0)^2 \cdot \text{Var}\,(r_0)$$

и тъй като

$$(\partial\, Y_i\,/\,\partial\, r_i) = 1/r_0 \text{ и } (\partial\, Y_i\,/\,\partial\, r_0) = r_i/r_0^2$$

с нормално разпределени данни и m_i и m_0 повторни проби:

$$\text{Var}\,(r_i) = \sigma^2/m_i$$

общата променливост на относителната реакция Y_i следователно става:

$$\text{Var}\,(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2\, m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4\, m_0$$

Грешката върху средната стойност на контролна проба е обратнопропорционална на корен квадратен от осреднените стойности на повторните контролни проби и в някои случаи може да се обоснове включването на предишни статистически данни, като по този начин в голяма степен се намалява грешката. Алтернативната процедура е данните да не се нормализират и да се налагат абсолютните стойности на реакциите, включително данните от реакциите на контролните проби, но като се въведе стойността на реакцията на контролната проба като допълнителен параметър, който се налага чрез нелинейна регресия. При използване на обикновеното уравнение за регресия с два параметъра този метод изисква налагане на три параметъра и следователно се нуждае от повече точки с данни от нелинейната регресия върху данни, които се нормализират с помощта на предварително зададена реакция от контролна проба.

Обратни доверителни интервали

Изчисляването на доверителните интервали за нелинейна регресия чрез обратна оценка е доста сложно и не е налична стандартна възможност в обикновените пакети от статистически компютърни програми. Приблизителните доверителни граници могат да бъдат получени със стандартните програми за нелинейна регресия с нова параметризация (Bruce and Versteeg, 1992), което включва повторно съставяне на математическото уравнение с желаните оценки на точките, например EC_{10} и EC_{50} като параметри, които ще се оценяват. (Нека функцията е I = f (α, β, концентрация) и като използваме дефиниционните съотношения f (α, β, EC_{10}) = 0,1 и f (α, β, EC_{50}) = 0,5 да заместим f (α, β, концентрация) с еквивалентна функция g (EC_{10}, EC_{50}, концентрация).

По-директно изчисляване (Andersen et al, 1998) се извършва чрез запазване на оригиналното уравнение и използване на разлагането на Taylor към средните стойности на r_i и r_0.

Напоследък станаха популярни методите „boot strap“. Тези методи използват измерените данни и често вземане на повторни извадки, насочвано чрез генератор на случайни числа, за оценка на разпределението на емпиричната променливост.

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.

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J.(1992) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. Env. 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

B.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 B.4-A)

б) Модифициран скрининг метод на OECD за определяне на DOC чрез скоростта на отмиране (метод B.4-Б)

в) Метод за отделяне на въглероден диоксид (CO_2) (модифициран метод на Щурм) (метод B.4-B)

г) Манометрична респирометрия (метод B.4-Г)

д) Метод на изолираните проби (метод B.4-Д)

е) MITI (Министерство на международната търговия и индустрията — Япония) (метод B.4-E)

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 са известни химичната структура и формулата, за да се изчисляват теоретичните стойности и/или да се проверяват измерените стойности на параметрите, например ThOD, $ThCO_2$, 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.

▼B

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	Респирометрия: отделяне на CO_2	+	—	+
Манометрична респирометрия	Манометрична респирометрия: потребление на кислород	+	+/–	+
Метод на изолираните проби	Респирометрия: разтворен кислород	+/–	+	+
MITI	Респирометрия: 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 респирометричните 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 CO_2 и потребление на кислород, като измерванията се правят на достатъчно чести интервали, за да може да се отчетат началото и краят 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 определяния. 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 $ThCO_2$) 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.

▼B

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 (I)
Концентрация на изпитваното вещество като						
mg/l			100		2—10	100
mg DOC/l	10—40	10—20		10—40		
mg ThOD/l			50—100		5—10	
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 суспендирани 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 Cu^{++} 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 партида 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 ОИСР, отделяне на CO_2, 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 MITI — 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, KH_2PO_4	8,50 g
	Дикалиев монохидрогенортофосфат, K_2HPO_4	21,75 g
	Динатриев монохидрогенортофосфат дихидрат, $Na_2HPO_4.H_2O$	33,40 g
	Амониев хлорид, NH_4Cl	0,50 g
	Разтварят се във вода и се долива до 1 литър. Стойността на pH на разтвора следва да бъде 7,4.	
б)	Калциев хлорид, безводен, $CaCl_2$	27,50 g
	или калциев хлорид дихидрат, $CaCl_2$, $2H_2O$	36,40 g
	Разтварят се във вода и се долива до 1 литър.	
в)	Магнезиев сулфат хептахидрат, $MgSO_4.7H_2O$	22,50 g
	Разтваря се във вода и се долива до 1 литър.	
г)	железен(Ш) хлорид хексахидрат, $FeCl_3.6H_2O$	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 HC1 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/1. 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 MITI (метод B.4-E) 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 CO_2 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 ОИСР и метода на изолираните проби са необходими по-разредени 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 MITI 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. Оставя се да се утаи за 1 час или се филтрува през груб хартиен филтър, а отлятата течност или филтратът се запазват при аеробни условия, докогато 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 MITI 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 инокуланта. 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 инокуланта.

— Контролна проба за инокуланта: съдържа само инокулант.

— Проба за контрол на процедурата: съдържа сравнителното вещество и инокуланта.

— 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 инокуланта 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 изразява 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_{bo} = средна начална концентрация на DOC в контролна проба с инокулант в минерална среда (mg DOC/1),

C_{bt} = средна концентрация на DOC в контролна проба с култура в минерална среда към времето t (mg DOC/1).

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:

$$\% \text{ абиотично разграждане } = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

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 B.4-A)

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 ± 2 °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 химичнен 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 pH 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 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 клатачната машина за започване на изпитването.

II.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.

II.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 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.

II.3. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

II.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 СКОРОСТТТА 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 такова:

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	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Средно (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 и D_2 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	Sa	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ЧАСТ III. **МОДИФИЦИРАН СКРИНИНГ НА ОИСР** (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, $MnSO_4.4H_2O$	39,9 mg
Борна киселина, H_3BO_3	57,2 mg
Цинков сулфат хептахидрат, $ZnSO_4.7H_2O$	42,8 mg
Амониев хептамолибдат, $(NH_4)_6\ MO_7O_{24}$	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 pH 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 клатачната 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 ОИСР

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 такова:

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				

(*) D_1 и D_2 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	Sa	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ЧАСТ IV. **МЕТОД ЗА ОТДЕЛЯНЕ НА CO_2** (МЕТОД B.4-B)

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 TOC/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 $ThCO_2$. 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 CO_2 кислород и несъдържащ CO_2 азот от газови колби в правилно съотношение (20 % O_2: 80 % N_2).

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 CO_2 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 CO_2. 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 прясно 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 CO_2 при дебит 30—100 ml/min. Периодично се вземат проби от абсорбента на въглероден диоксид за анализ на съдържанието на CO_2. 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 pH 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 CO_2 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 CO_2 след титруване се дава като:

$$mg\ CO2 = (100 \times CB - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

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 CO_2 се дава от:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml HCI тцтрувани} = 1,1 \times \text{ml HCI}$$

Така в този случай факторът за изчисляване на отделеното количество mg CO_2 по обема на HCl, изразходвана за титруване, е 1,1.

Изчисляват се поотделно теглата на отделения CO_2, произведен само от инокуланта и от инокуланта плюс изпитваното вещество, като се използват съответните стойности от титруването; а разликата е теглото на CO_2, 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

CO_2 от инокуланта = 1,1 × (50 - 48) = 2,2 mg

▼B

CO_2 от инокуланта плюс изпитваното вещество = 1,1 × (50 - 45) = 5,5 mg

и така теглото на произведения CO_2 от изпитваното вещество е 3,3 mg.

Процентът на биоразграждане се изчислява от:

$$\% \text{ разграждане} = \frac{(\text{те произведен } CO_2 \times 100)}{(\text{Th}CO_2 \times \text{mg прибавено изпитвано вещсство})}$$

или

$$\% \text{ разграждане} = \frac{(\text{mg произведен } CO_2 \times 100)}{(\text{mg ТО добавено при изпитване то} \times 3,67)}$$

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:

$$\% \text{ Th}CO_2 = \frac{(\text{mg IC встъкленицата} - \text{mg IC в контролата})}{(\text{mg ТОС прибавен като вещсство за изпитване})} \times 100$$

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

$ThCO_2$: mg CO_2

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)		$\frac{\text{Кумулиран } CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	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

$$\% \text{ изразходван DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **АБИОТИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ** (по избор)

$$\% \text{ абиотично разграждане} = \frac{\text{образуван } CO_2 \text{ в стерилна стъкленица след28 дни (mg)}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

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 партиди, 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 pH и ако е необходимо, се коригират до 7,4 ± 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 CO_2.

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 pH 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

$$\text{BOD} = \frac{(\text{те } O_2 \text{ усвоено от изпитваното вещество } - \text{ mg } O_2 \text{ усвоен от контгюлната ттооба})}{(\text{mg изпивано вещество в колбата})}$$

= mg O_2 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 (NH_4 или NO_3) 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 O_2/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 pH 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

V.3.3. **Протокол от изпитването**

Вж. I.8.

V. 4. **ПРОТОКОЛ ЗА ДАННИ**

Тук е даден примерен протокол за данни.

ИЗПИТВАНЕ ЧРЕЗ МАНОМЕТРИЧНА РЕСПИРОМЕТРИЯ

1. **ЛАБОРАТОРИЯ**

2. **ДАТА НА ЗАПОЧВАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**

3. **ИЗПИТВАНО ВЕЩЕСТВО**

Име:

Концентрация на изходния разтвор: … mg/l

Начална концентрация в средата, C_o: … mg/l

Обем на колбата за изпитване (V): … ml

ThOD или COD: … mg O_2/mg изпитвано вещество (NH_4 или NO_3)

4. **ИНОКУЛАНТ**

Източник:

Извършена обработка:

Предварителна подготовка, ако има такова:

Концентрация на суспендирани частици в реакционната смес: … mg/l

5. **УСВОЯВАНЕ НА КИСЛОРОД: БИОРАЗГРАДИМОСТ**

		Време (ден)											
		0		7		14			21			28	
Усвоен O_2 (mg) от изпитваното вещество	1												
	2												
	a, средно												
Усвоен O_2 (mg) от контролен инокулант	3												
	4												
	b, средно												
Коригирано BOD (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD за mg изпитваното вещество	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Време (ден)											
		0		7		14			21			28	
% на разграждане $\frac{\text{БПК}}{\text{ThOD}} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Средно (*)												

V=обем на средата в колбата за изпитване
(*) D_1 и D_2 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})	(Co)
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)

$$\% \text{ абиотично разграждане } = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

ЧАСТ VI. **ИЗПИТВАНЕ ПО МЕТОДА НА ИЗОЛИРАНИТЕ ПРОБИ** (МЕТОД B.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 усвоения 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 филтрата 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 O_2/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:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ поет от изпитваното вещество} - \text{mg } O_2 \text{ поет от празната проба})}{(\text{mg изпитвано вещество в колбата})} = \frac{\text{mg } O_2}{\text{изп. вещество}}$$

▼B

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 (NH_4 или NO_3) според това, което се знае или се очаква да стане при наличие на нитрификация (приложение II.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 O_2/mg изпитвано вещество

4. **ИНОКУЛАНТ**

Източник:

Извършена обработка:

▼B

Предварителна подготовка, ако има такова:

Концентрация в реакционната смес: … mg/l

5. **ОПРЕДЕЛЯНЕ НА РАЗТВОРЕНИЯ КИСЛОРОД**

Метод: по Winkler/с електрод

Анализи на съдържанието в колбите

Време на инкубация (дни)			Разтворен кислород (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Инокулант без вещество	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: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
КОЛБА 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Намаляване след n дни (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
КОЛБА 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{Конц. на изп.} \times \text{ThOD химикал}}$				
КОЛБА 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{Конц. на изп.} \times \text{ThOD химикал}}$				
$\%\ \text{Dсредно (*)} = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Не се изчислява средна стойност, ако има значителна разлика между повторенията.

m_{to} = стойност в колбата към време 0

m_{tx} = стойност в колбата към време x

m_{bo} = средна стойност в контролата към време 0

mbx = 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: ($m_{bo} - m_{b28}$) 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 M.I.T.I** (МЕТОД B.4-E)

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 затъмнен, затворен респирометър при 25 ± 1 ºC. Отделеният въглероден диоксид се абсорбира в натриева вар. Биоразградимостта се изразява като процент на усвоения 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**

a) Автоматичен електролитен BOD-метър или респирометър, нормално съоръжен с 6 колби, по 300 ml всяка, и с чаши, съдържащи абсорбент на CO_2.

▼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 додекахидрат, $Na_2HPO_4\ 12H_2O$	44,60 g
	Амониев хлорид, NH_4Cl	1,70 g
	Разтварят се във вода и се доливат до 1 литър	
	Стойността на pH на разтвора трябва да е 7,2	
б)	Магнезиев сулфат хептахидрат, $MgSO_4\ 7H_2O$	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, $FeCl_3\ 6H_2O$	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 канални 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 pH на супернатантата до стойност 7 ± 1 с натриев хидроксид или фосфорна киселина.

Използва се подходящ обем от филтрираната супернатанта, за да се напълни утаителен 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 (pH 7), съдържащ по 0,1 % от глюкоза, пептон и монокалиев ортофосфат, и се възобновява аерацията. Тази процедура се повтаря по веднъж на ден. Утаителят трябва да работи по правилата на добрата практика: оттокът трябва да е бистър, температурата трябва да се поддържа 25 ± 2 °C, pH 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 захранена.

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 CO_2 се прибавят към всички колби в специалните чашки. Регулира се pH 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 pH 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:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ употребен от изпитваното вещество} - \text{mg } O_2 \text{ употребен от контролата})}{(\text{mg изпитвано вещество в колбата})}$$

= mg O_2 / 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 O_2/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 MITI (I)

1. **ЛАБОРАТОРИЯ**

2. **ДАТА НА ЗАПОЧВАНЕ НА ИЗПИТВАНЕТО**

▼B

3. **ИЗПИТВАНО ВЕЩЕСТВО**

Име:

Концентрация на изходния разтвор: … mg/l като химично вещество

Начална концентрация в средата, C_o: … 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	$\frac{(a - b)}{C_o V}$	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**

	Остатъчно 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 a_1 и a_3.

8. **ЗАБЕЛЕЖКИ**

Следва да се приложи крива за BOD във времето, ако има такава.

▼B

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 $m.s^{-2}$(± 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.

$ThCO_2$: 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, отделян 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.

▼B

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:

   $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

   без нитрификация,

   $$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

   или с нитрификация

   $$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Химична потребност от кислород (COD)**

   Химичната потребност от кислород (COD) се определя според метод B.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. Обеми 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 мембранния 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 m. s^{-2} (4 000 g) за 15 min. Методът не е надежден при начални концентрации < 10 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 Stoffkenngrosen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoff-bedarfs (CSB) (H 41), Normenausschus (NAW) in DIN Deutsches Institut fur Normung e. V.;

(4) Gerike, P., The biodegradability testing of poorly watersoluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13(1), 169;

▼B

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 CO_2, 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.

▼B

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 инертено (Reynolds et al., 1987).

Подобни или идентични 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 EC_{50} (или по-ниски от стойностите на EC_{20}) получени при изпитването на токсичността. Съединения със стойности на EC_{50}, по-високи от 300 mg/l, не е вероятно да имат токсични ефекти при изпитването за лесна биоразградимост.

Стойности на EC_{50}, 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 ^{14}C. 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

▼B

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:

$$2\ NH_4Cl + 3O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2H_2O \quad (1)$$

$$2HNO_2 + O_2 = 2HNO_3 \quad (2)$$

Или обобщено:

$$2\ NH_4Cl + 4O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

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:

O_2, консумиран при образуване на нитрат = 4,57 × увеличението на концентрацията на нитрат (4)

и

O_2, консумиран при образуване на нитрит = 3,43 × увеличението на концентрацията на нитрит (5)

и

O_2, изгубен при преобразуването на нитрит = - 3,43 × намалението на концентрацията на нитрит (6)

Така че:

Потреблението на O_2, дължащо се на нитрификация = ± 3,43 × изменението на концентрацията на нитрит + 4,57 × увеличението на концентрацията на нитрат (7)

И така:

Потреблението на O_2, дължащо се на окисление на въглерода = общото наблюдавано потребление – потреблението, дължащо се на нитрификация (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 × 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

B.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 biochemish 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

B.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 трудноразтворими 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 наляганeто (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

B.7. РАЗГРАЖДАНЕ — АБИОТИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ: ХИДРОЛИЗА КАТО ФУНКЦИЯ ОТ РН

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 ^{14}C) 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 предпочита 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, ^{3}H 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 A.6];

б) разтворимост в органични разтворители;

в) налягане на парите [Метод на изпитване A.4] и/или константа от закона на Хенри;

г) коефициент на разпределение n-октанол/вода [Метод на изпитване A.8];

д) константа на дисоциация (pK_a) [Ръководство на ОИСР 112] (9);

е) там където е необходимо, степен на пряка и непряка фототрансформация 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 повторяемостта 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 n-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:

— pH-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 разтоворители, 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 повисока 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 pH 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]).

pH на всеки буферен разтвор следва да се провери с калибриран pH-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 ± 0,5°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—70 °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 ± 0,5°C и pH 4,0, 7,0 и 9,0. Ако след 5 дни се наблюдава хидролиза, по-малка от 10 процента ($t_{0,5\ 25°C}$ > 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]) [3], 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.

▼B

1.8.5.2. *Хидролиза на нестабилни вещества (стъпало 2)*

Изпитване на по-високо стъпало (напреднало) следва да се проведе при стойностите на pH, 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 % хидролизиране 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 взимат 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 pH, 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. pH 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 pH 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 ≥ 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 pH 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, $к_{неутрален,}$ и k_{OH}), така и на уравнението на Арениус:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{неутрал} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,неутрален,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

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 pH 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 pH 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;

— pH 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 pH и температурата;

— таблици с резултати от уравнението на Арениус за температура 20 °C/25 °C с pH, скоростна константа [час$^{-1}$ или ден$^{-1}$], време на полуразпад или DT_{50}, температура [°C], включително интервала на доверие и коефициетните на корелация (r^2) или подобна информация;

— предложен път на хидролиза.

▼B

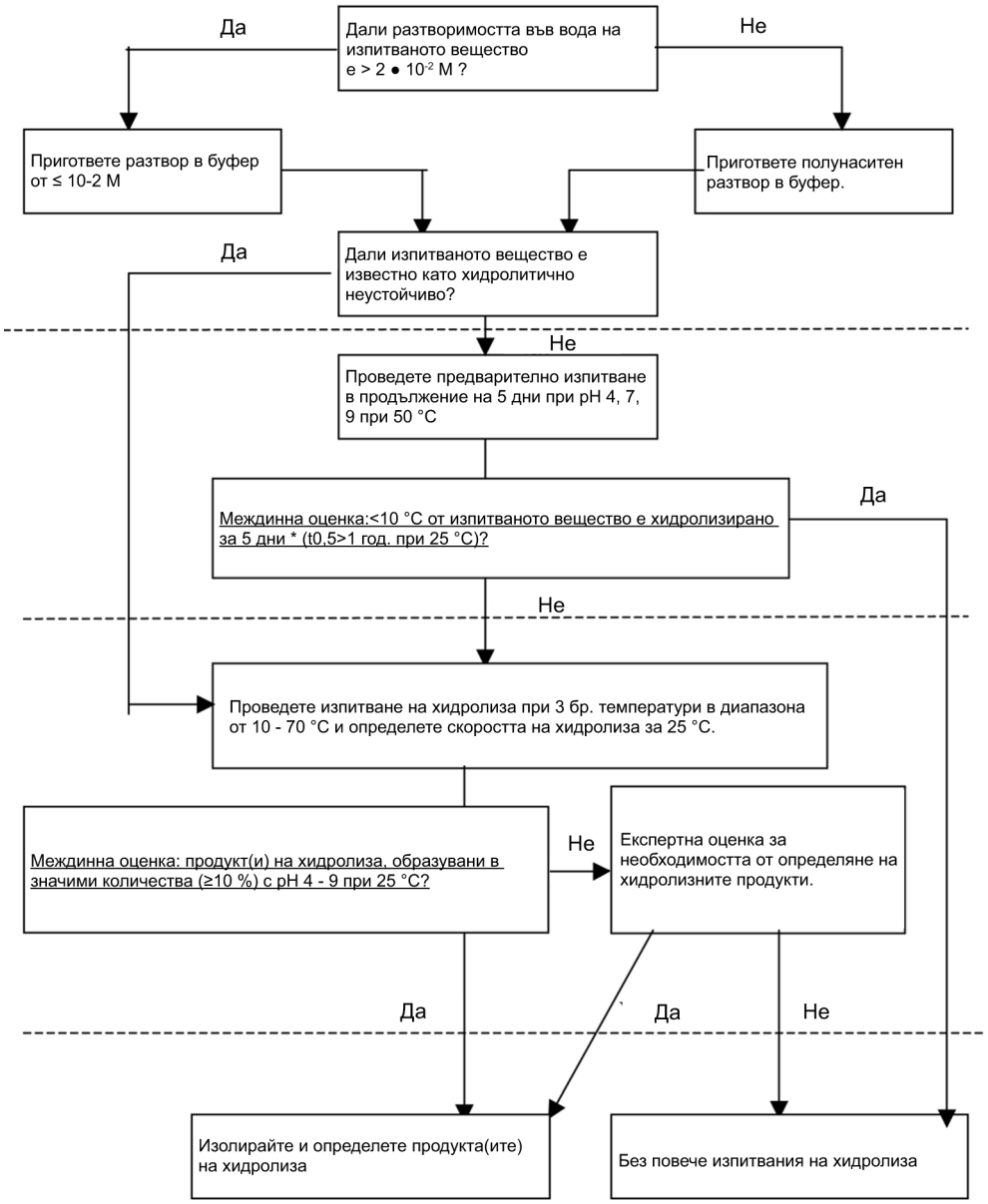
4. **ПРЕПРАТКИ**

1. ОИСР (1981 г.). Хидролиза като функция от Ph. Насоки на ОИСР 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 ºC. 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. BBA (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. ОИСР (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. ОИСР (1993 г.). Насоки за изпитването на химични вещества, Париж, ОИСР (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.

▼B

Приложение 1

Схема на изпитване за стъпална хидролиза



10 % хидролизиране на изпитваното вещество при 50 ºC съответства на период на полуразпад от прибл. 30 дни, което съответства на прибл. 1 година при 25 ºC.

▼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:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Скоростта с която концентрацията на RX намалява в този опростен процес се дава чрез:

скорост = k $[H_2O]$ [RX] реакция от втори порядък

или

скорост = k [RX] 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:

$$k_{obs} = k[H_2O] \qquad [2]$$

и може да бъде определена от израза (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

където

t = време

и C_o, C_t = концентрации на RX във време 0 и t.

Единиците на тази константа имат димензия от (време)$^{-1}$ и времето на полуразпад на реакцията (времето за което 50 % от RX ще реагира) се дава с:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

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

DT $_{50}$ (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 In 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: $T_2 > T_1$

▼B

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 Sörensen (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 M монокалиев 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 M H_3B0_3 в 0,1 M 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 M монокалиев 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 M монокалиев 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		Sörensen 18 °C	Walbum, pH при		
ml боракс	ml HCl/N aOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M 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 M 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 M монокалиев фосфат + 0,0667 M двунатриев фосфат при 20 °C	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼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

▼B

B.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 кратковременно пресяващо изпитване за ефекта на химическите вещества върху земните червеи, чрез постъпване по кожен и стомашно-чревен път.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ЕДИНИЦА

LC_{50}: 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 pH възможно най-близо до 5,5—6,0 без видими остатъци от растения и фино смлян),

▼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

Стъклени 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 нетретираната 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 LC50, 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 LC_{50},

— резултати от изпитването, включително всички използвани данни,

— описание на наблюдаваните симптоми или на измененията в поведението на експерименталните организми,

— смъртност при контролите,

— LC_{50} 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. ОИСР, 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 „Toxizitatstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in kiinstlichem Boden“, in: Rudolph/Boje, Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Допълнение

Размножаване и отглеждане на червеите 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. Излюпените от какавидите земни червеи се използват за изпитване, когато съзреят (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 pH 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.

▼B

B.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 дейонизирана 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 дейонизирана вода:	
амониев хлорид, NH_4Cl, аналитичен реактив:	38,5 g,
натриев дихидрогенфосфат, $NaH_2PO4.2H_2O$, 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

Стъклени съдове с обем един до четири литра (например цилиндрични съдове).

Бъркачка със стъклена или метална бъркалка, монтирана на подходящ вал (бъркалката 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.

Стъклена 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 pH.

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 сгъстен 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 pH трябва да се проверява на редовни интервали (например ежедневно) и ако е необходимо, да се коригира на pH 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 филтрата 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 функционалния капацитет на активираната утайка. За тази цел е полезен диетиленгликолът.

Адаптиране

Ако анализите се провеждат на относително кратки интервали (например ежедневно), адаптирането може да бъде лесно разпознато 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 окисляем 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 T 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 прекратено.

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 14C-изпитвано вещество могат да позволят по-висока чувствителност. При изпитвано съединение, маркирано с 14C, възстановяването на $14CO_2$ 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) ОИСР, Париж, 1981, Test Guideline *302 B,* Решение на Съвета C(81) 30 final.

(2) Приложение V B.9 Разграждане: Химична потребност от кислород, Директива 84/449/ЕИО на Комисията, *Официален вестник на Европейските общности* L 251, 19.9.1984 г.

▼B

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

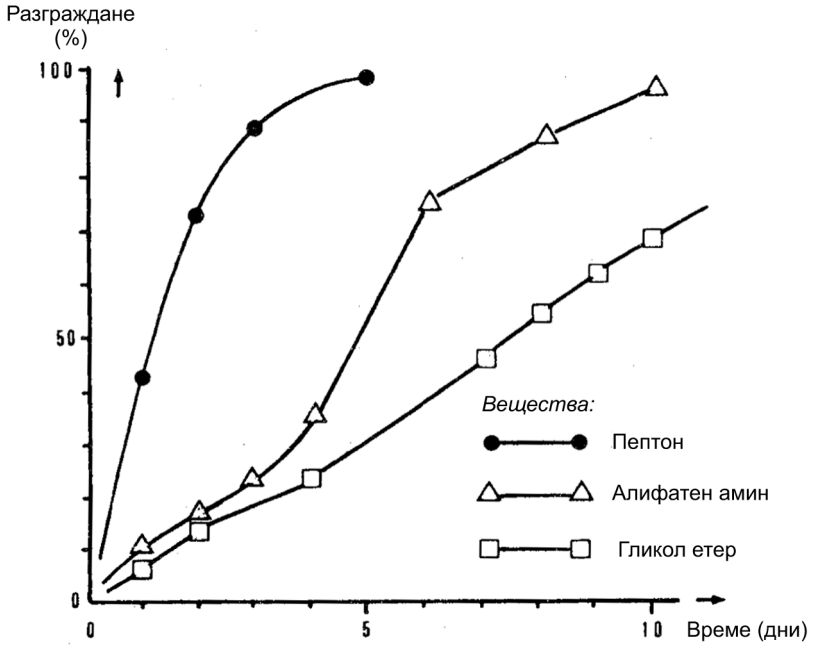
Време на изпитванет0	Контролно вещество:				Изпитвано вещество		
	Празна проба за РОВ ([1]) mg/l	РОВ ([1]) mg/l	Нетна стойност на РОВ mg/l	Разграждане %	РОВ ([1]) mg/l	Нетна стойност на РОВ mg/l	Разграждане %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 часа	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 ден	6,1	288,3	282,2	6	373,3	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.

▼B

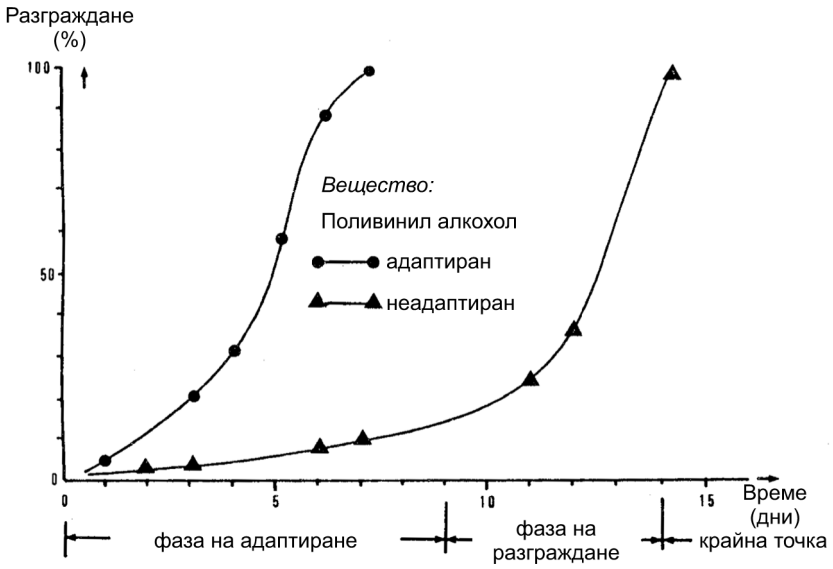
Фигура 1

Примери за криви на биологично разградимост



Фигура 2

Примери за адаптиране на утайка



▼M4

B.10. ИЗПИТВАНЕ ЗА СИМУЛИРАНЕ НА АЕРОБНО ПРЕЧИСТВАНЕ НА ОТПАДЪЧНИ ВОДИ: B.10-A: МОДУЛИ С АКТИВНА УТАЙКА — B.10-Б: БИОФИЛМИ

B.10-A: Модули с активна утайка

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСР (TG) 303 (2001). През петдесетте години бе установено, че нововъведните 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 B.4 A—E от настоящото приложение. Опитът с много повърхностноактивни вещества и други химикали показа, че онези от тях, които преминат 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 B.12 (7) и B.19 (8) от настоящото приложение), но само някои от последните са били разградени в изпитването за симулиране, докато химическите вещества, които не са преминали изпитванията за присъща биоразградимост, не се разграждат при изпитванията за симулиране (9)(10)(11).

4. За определени цели са достатъчни и изпитванията за симулиране, проведени при един набор от работни условия. резултатите се изразяват като процент на елиминиране на изпитвания химикал или на разтворения органичен въглерод (DOC). В настоящия метод за изпитване се дава и описание на такова изпитване. За разлика обаче от предишната версия на настоящата глава, в която се описва само един тип апарати за третиране на синтетични отпадъчни води в режим на свързани модули при използване на относително груб метод за изразходване на утайка, настоящият текст предлага редица изменения. Описани са алтернативни варианти по отношение на

▼M4

типовете апарати, начина на действие, отстраняването на изразходваните отпадъчни води и утайки. Настоящият текст следва стриктно текста на ISO 11733 (12), който беше старателно проверен при подготовката му, въпреки че методът не беше обект на кръгово изпитване.

5. За други цели се изисква концентрацията на изпитвания химикал в изходящите отпадъчни води да се определи по-точно, а за това е необходим по-обхватен метод. Например, скоростта на изразходване на утайката трябва да се контролира по-прецизно всеки ден по време на периода на изпитването, а модулите трябва да се задействат с набор от различни стойности на скоростта на изразходване. За да може методът да бъде пълен, изпитванията трябва да се проведат при две или три различни стойности на температурата: такъв метод е описан от Birch (13) (14), а обобщение на метода е представено в допълнение 6. настоящото равнище на познанията обаче е все още недостатъчно, за да се определи кои от кинетичните модели са приложими към биоразграждането на химикалите при обработката на отпадъчните води и изобщо във водна среда. Прилагането на кинетичния модел на Моно, посочен като пример в приложение 6, е ограничено до химикали, налични в концентрации от 1 mg/l и по-високи, но според някои дори и това се нуждае от доказателство. В допълнение 7 се изисква и провеждането на изпитвания при концентрации, които по-вярно отразяват концентрациите, констатирани в отпадъчните води, но подобни изпитвания, както и изпитванията от приложение 6, са включени в допълненията, вместо да бъдат оформени като самостоятелни методи за изпитване.

Филтри

6. Обръщано е по-малко внимание на моделиране на капещи биофилтри, може би защото оборудването за моделиране е с по-големи размери и е по-малко компактно от моделите на инсталации с активна утайка. Gerike *et al*. са разработили модули с капещ биофилтър и са ги използвали в режим на свързани модули (15). Посочените филтри са относително големи (с височина 2 m; обем 60 l) и всеки от тях е изисквал по 2 l/h отпадъчни води. Baumann et al (16) моделират капещи филтри, като 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 CO_2 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 прести 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 пораждат. 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 Husmann (допълнение 1, фигура 1) или модул с порест съд (допълнение 1, фигура 2). И в двата случая са необходими съдове с подходящ размер за събиране на входящите и на изходящите води, както и помпи за дозиране на входящите води, или смесени с разтвора на изпитвания химикал, или поотделно.

20. Всеки модул за активна утайка се състои от съд за аериране с известна вместимост от около 3 литра активна утайка и сепаратор (вторичен утаител) с вместимост около 1,5 литра; обемите могат да се променят до известна степен чрез коригиране на височината на утаителя. Допускат се и съдове с друг размер, ако се подлагат на съпоставими хидравлични натоварвания. Ако не е възможно температурата в помещението, в което се провежда изпитването, да се поддържа в желаните граници, се препоръчва използването на съдове с водна риза с термостат. Активната утайка се връща непрекъснато или на равни интервали от сепаратора в съда за аериране, като се използва въздушна (ерлифт) или дозираща помпа.

21. Системата с порест съд се състои от вътрешен порест цилиндър с конусообразно дъно, поставен в малко по-голям съд със същата форма, но изработен от непропусклива пластмаса. Подходящ материал за порестия съд е порест полиетилен с максимален размер на порите 90 μm и дебелина 2 mm. Отделянето на утайката от третираната органична среда се осъществява чрез диференциално преминаване през порестата стена. Изходящата течност се събира в пръстеновидното пространство, откъдето прелива в събирателния съд. Тъй като няма утаяване, няма и връщане на утайката. Цялата система може да бъде монтирана в контролирана чрез термостат водна баня. На началните етапи, порестите контейнери се запушват и могат да прелеят.

▼M4

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 непропускливият 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 накисне 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/s^2.

Аналитично оборудване

24. Апарати, позволяващи да се определи:

— DOC (разтвореният органичен въглерод) и TOC (общият органичен въглерод), или ХПК (химически потребният кислород),

— специфичен химикал, ако се изисква,

— твърди вещества в суспензия, pH, концентрация на кислорода във водата,

— температура, киселинност и алкалност,

— амониеви йони, нитрити и нитрати, ако изпитването се провежда в условията на азотфиксиране.

Води

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

26. Дейонизирана вода със съдържание на DOC по-малко от 2 mg/l.

Органична среда

27. В качеството на органична среда се допуска използването на синтетични отпадъчни води, битови отпадъчни води, или на смес от тях. Беше доказано (11) (14), че използването само на битови отпадъчни води често води до повишено елиминиране на DOC и дори позволява елиминирането и биоразграждането на някои химикали, които не са биоразградими при използване на синтетични отпадъчни води по рецептурата на ОИСР. Също така, добавянето, постоянно или на порции, на битови отпадъчни води често стабилизира активната утайка, включително и способността на последната добре да се утаява. Поради това се препоръчва използването на битови отпадъчни води. Следва да се измерва концентрацията на DOC или ХПК във всяка нова партида органична среда. Киселинността или алкалността на органичната среда следва да бъде известна. Може да се наложи в органичната среда да се добави подходящ буфер (натриев хидрогенкарбонат или калиев дихидрогенфосфат), ако тя е с ниска киселинност или алкалност, за да се поддържа pH 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 ($Mg_2SO_4 \cdot 7H_20$), 2 mg. Тези синтетични отпадъчни води по ОИСР 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 утаител, 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 pH на изходния разтвор. Получаването на екстремни стойности означава, че добавянето на химикала може да повлияе на pH на активната утайка в системата за изпитване. В този случай изходният разтвор се неутрализира за получаване на стойност на pH, равна на 7 ± 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.

Дозиране 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 спомага да се поддържа постоянно време на задържане на утайката, което е променливата, определяща стойността на концентрацията на изпитвания химикал в изходящите води.

42. През цялото времетраене на изпитването поне веднъж на ден се отстранява всякаква утайка, полепнала 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 $FeCl_3$ с концентрация 50 g/l), но трябва да се удостовери, че добавянето на $FeCl_3$ 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 pH на активната утайка в съдовете за аериране. Гарантира се, че винаги има достатъчно количество кислород (> 2 mg/l) и че температурата се поддържа в необходимия обхват (обикновено 20 °C до 25 °C). Стойността на pH се поддържа равна на 7,5 ± 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 захранват контролните съдове и съдовете за провеждане на изпитването. С помощта на специфичен анализ се измерва концентрацията на изпитвания химикал в изпитваните входящи води или 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 μm или се центрофугират при около 40 000 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 биоразграждане.

47. Използването на ХПК може да доведе до проблеми по отношение на анализа при ниски концентрации и поради това то се препоръчва, само ако концентрацията при изпитването е достатъчно висока (около 30 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 утаителите. 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:

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

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_o = 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:

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

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_{tc} на изпитвания химикал, определените дневни стойности на елиминирането (D_t, точка 52) трябва да се коригират с помощта на уравнението:

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

Изразяване на резултатите от изпитването

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

Адсорбция

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

▼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 B.4 Г, Д и Е от настоящото приложение (6) или изпитване с измерване на отделянето на въглероден диоксид (глава B.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, pH, температура, концентрация на кислород, суспендирани твърди вещества, и азотсъдържащи химикали, ако е подходящо,

— всички изчислени стойности на D_t (или D_{tc}), 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 B.4 от настоящото приложение, Определяне на пряката биологична разградимост.

(7) Глава B.12 от настоящото приложение, Биологично разграждане — модифицирано SCAS изпитване.

(8) Глава B.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 noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.

(15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753-758.

(16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(17) Her Majesty’s Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91-98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998). Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

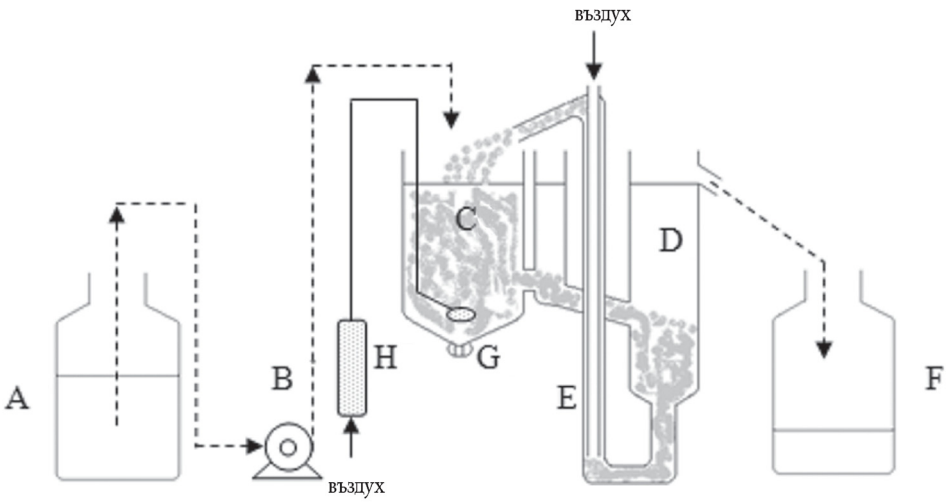
▼M4

Допълнение 1

Фигура 1

Оборудване, използвано за оценка на биоразградимостта

Модул на Husmann

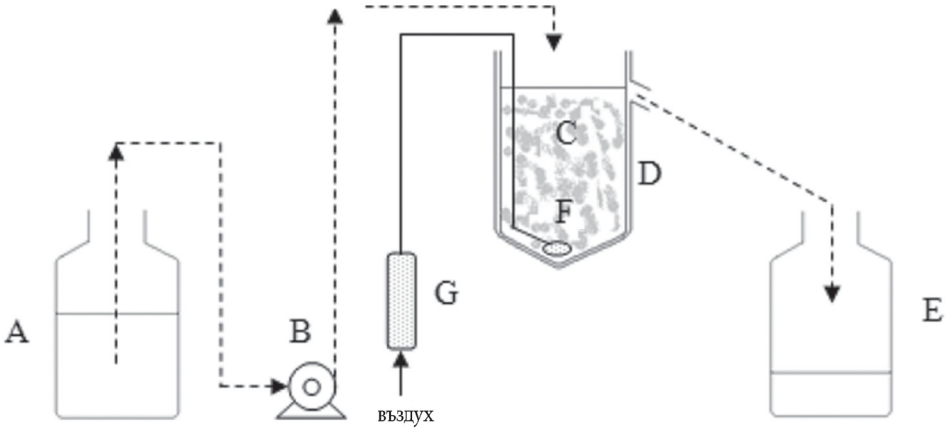


A	Съд за съхранение	E	Въздушна (ерлифт) помпа
B	Дозираща помпа	F	Съд за събиране
C	Камера за аериране (с капацитет 3l)	G	Аератор
D	Утаител	H	Дебитомер за въздух

Фигура 2

Оборудване, използвано за оценка на биологичната разградимост

Порест съд

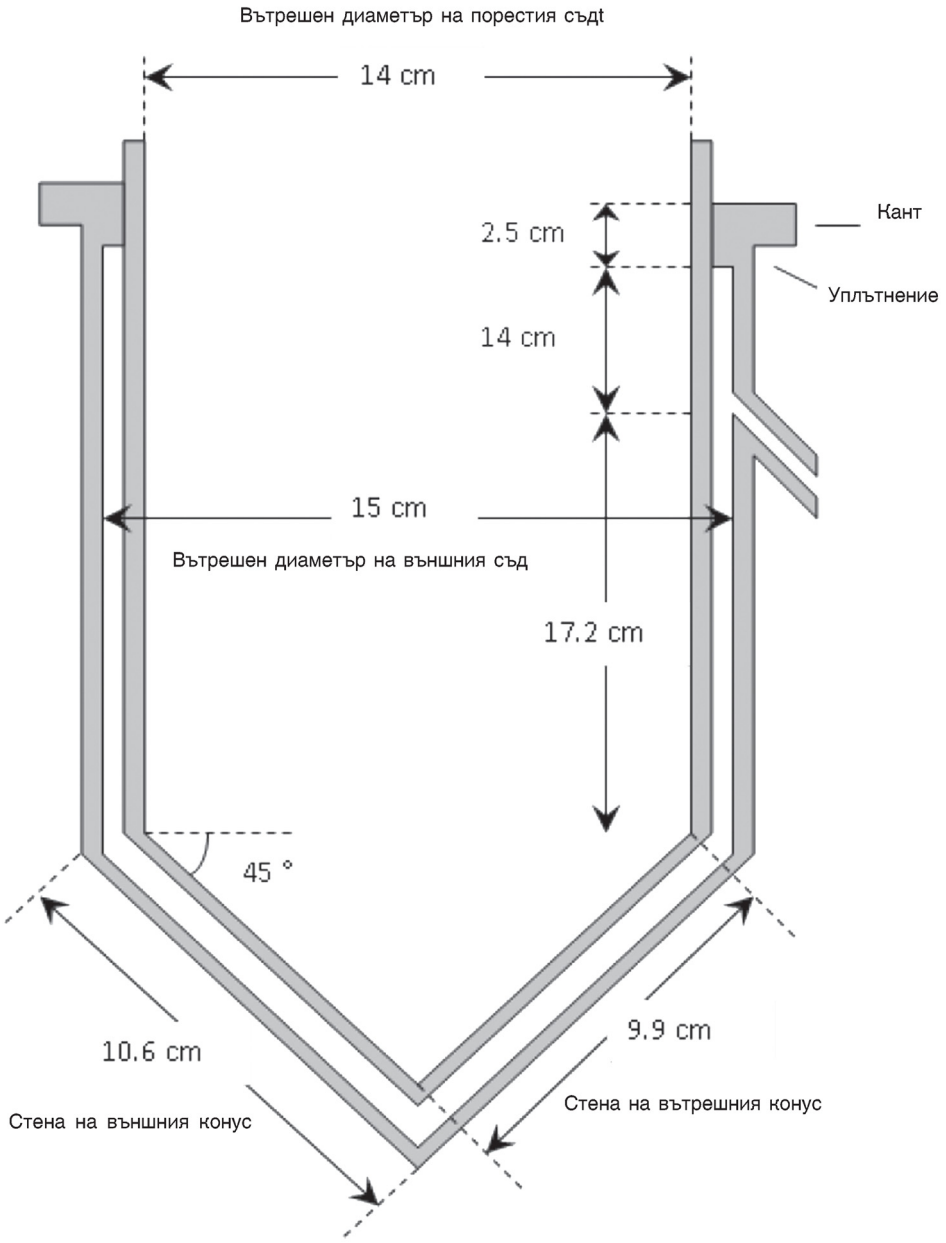


A.	Съд за съхранение	E	Съд за събиране
B.	Дозираща помпа	F	Дифузор
C.	Порест съд за аериране		
D.	Външен непропусклив съд	H	Дебитомер за въздух

▼M4

Фигура 3

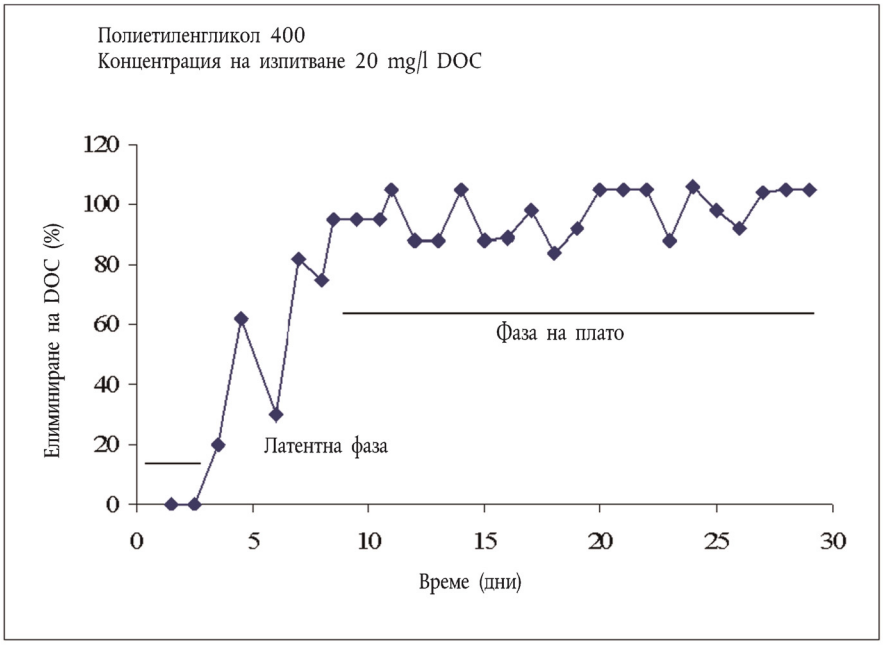
Подробности за трилитровия съд за аериране с порест съд



▼**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 B.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_o на БПК, DOC, ХПК и т.н. за изпитвателния и за контролния модул може да се изчисли с помощта на уравнението:

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

   където:

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

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

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

▼**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 B.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 приложим 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 Г), като се използва инокулум от утайка, изложена на изпитвания химикал в изпитването за симулиране.

Летливи химикали

Прилагането на изпитвания за симулиране на третирането на отпадъчните води към летливите химикали е както спорно, така и проблемно. Както и за малко разтворимите изпитвани химикали, публикувани са много малко доклади, които описват изпитвания за симулиране, при които се използват летливи химикали. Чрез херметично затваряне на резервоара за аериране и утаителя 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 Tenax 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 ефикасно. 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 небиологично изпитване процентът (R_{VP}) от изпитвания материал, изведен от системата, може да се изчисли с помощта на израза:

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

където

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

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

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

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

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

където

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

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

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

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

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

където

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

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

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

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

д) Сравнението между дела на изпитвания химикал, изведен съответно от биологичните (R_v) и небиологичните (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

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

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

$S_V = 22{,}5$ mg/l

$S_E = 50$ µg/l

▼**M4**

Следователно:

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % 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 B.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. Условията на работа на модулите с активна утайка и изборът на входящи води позволяват колебания в доста широки граници на концентрацията на изпитвания химикал в изходящите води. Изпитванията се провеждат само при една номинална концентрация на твърдите частици в утайката или една стойност на номиналното време на задържане на утайката (ВЗК), и описаните режими на изразходване на утайката могат да доведат до значителни колебания на ВЗК по време на изпитването в два последователни дни, но също и в рамките на един ден.

2. В този вариант (1)(2) ВЗК се поддържа в много по-тесни граници в рамките на всеки 24-часов период (както се прави в по-голям мащаб), което води до по-постоянна концентрация на изходящите води. Препоръчва се използването на битови отпадъчни води, тъй като с тях се получават по-постоянни и по-високи стойности на процента на елиминиране. Освен това, изследва се въздействието на много стойности на ВЗК, а в по-подробно изследване може да се определи въздействието на температурен обхват върху концентрацията на изходящите води.

3. Все още няма консенсус кои са работещите кинетични модели, когато химикалите претърпяват биоразграждане в условията на пречистване на отпадъчни води. Бе избрано (1) (2) върху събраните данни да се приложи моделът на Моно за бактериалния растеж и използването на субстрата, тъй като методът е предназначен да се използва само спрямо химикали, произвеждани в промишлени количества, които поради това присъстват в отпадъчните води с концентрация от над 1 mg/l. Валидността на опростения модел и направените допускания беше определена с помощта на етоксилати на алкохоли, които имат различна степен на първична биоразградимост (2) (3).

Забележка: Настоящият вариант в голяма степен повтаря текста, описващ настоящия метод за изпитване B.10-A, 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 изискането 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 утаител, 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 утаителя.

▼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 B.10-A, точки 12 и 13.

ПРАГОВИ НИВА

8. Прилага се глава B.10-A, точки 14 и 15.

РЕФЕРЕНТЕН ИЗПИТВАН ХИМИКАЛ

9. Прилага се глава B.10-A, точка 16.

ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ИЗПИТВАНИЯТА

10. Прилага се глава B.10-A, 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 B.10-A). 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 периодично с помощта на таймер-превключвател, например като работи 10 секунди на минута с дебит от 3 ml/min, помпата осигурява дебит на изразходваната утайка от 0,5 ml/min.

Апарат за филтруване или центрофуга

13. Прилага се глава B.10-A, точка 23.

Аналитично оборудване

14. Прилага се глава B.10-A, точка 24.

Води

▼**M4**

15. Прилага се глава B.10-A, точки 25 и 26.

Органична среда

16. Прилага се глава B.10-A, точка 27.

Синтетични отпадъчни води

17. Прилага се глава B.10-A, точка 28.

Битови отпадъчни води

18. Прилага се глава B.10-A, точка 29.

Активна утайка

19. Прилага се глава B.10-A, точка 30.

Изходни разтвори на изпитвани вещества

20. Прилага се глава B.10-A, точки 31 и 32.

ПРОЦЕДУРА

Приготвяне на инокулум

21. Прилага се само глава B.10-A, точка 34 — използва се само активна утайка (около 2,5 g/l).

Брой изпитвателни модули

22. За обикновено изпитване, т.е., такова, с което се цели да се определи процентът на елиминиране, е достатъчно определянето на едно ВЗК, но за да съберат данни за изчисляване на опитни кинетични константи, са необходими 4 или 5 стойности на ВЗК. Обикновено се избират стойности между 2 и 10 дни. На практика подходящо е да се извършва изпитване, като едновременно се приложат 4 или 5 стойности на ВЗК при една и съща температура; в по-разширени изследвания се използват същите стойности на ВЗК, като са възможни и стойности от друг обхват, при други температури в обхвата 5—20 °C. За първичното биоразграждане (основно използване) обикновено се изисква само един модул за набор от условия. За определяне обаче на крайното биоразграждане, за всяка комбинация от условия се изисква контролен модул, зареждан с отпадъчни води, но не и с изпитвания химикал. Ако се смята, че изпитваният химикал е наличен в използваните отпадъчни води, необходимо е да се използва контролен модул при определянето на първичното биоразграждане, както и да се направят необходимите корекции в изчисленията.

Добавяне на органичната среда и изпитвания химикал

23. Прилага се глава B.10-A, 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 ± 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 B.10-A, точки 40—43, но ВЗК се контролира само чрез „постоянно“ изразходване на утайката.

Проби и анализ

25. Прилага се глава B.10-A, 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 B.10-A, точки 52—54.

Изразяване на резултатите от изпитването

27. Прилага се глава B.10-A, 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_o/X_o) се поддържа ниско, напр. 0,025, а присъщите стойности се появяват, когато съотношението е високо, напр. най-малко 20. И в двата случая S_o трябва да е равна на съответната стойност на константата на полунасищане Ks 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**

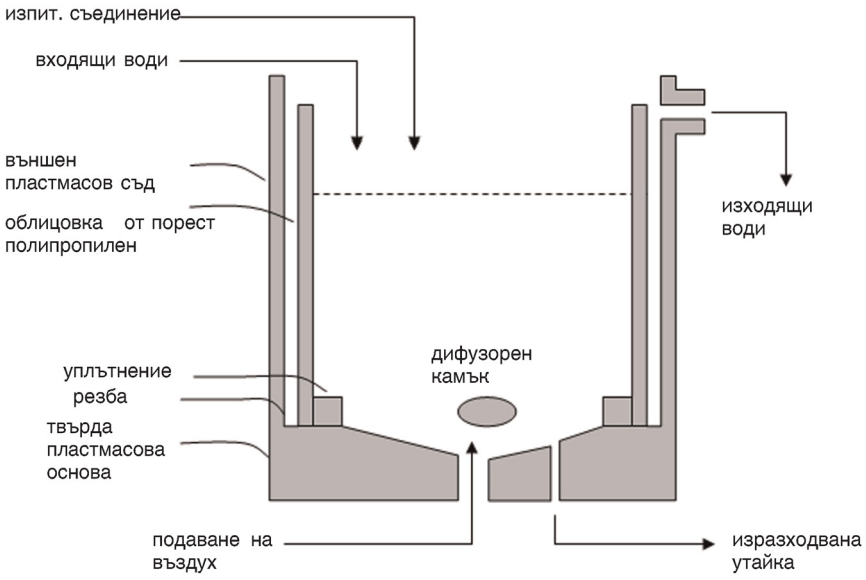
(4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.

(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:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

или

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

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:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

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

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**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)

X_1 = концентрация на твърди вещества в съда за аериране (mg/l).

X_2 = концентрация на твърди вещества в изходящите води (mg/l)

Q_0 = дебит на входящите води (l/d)

Q_1 = дебит на изразходваната утайка (l/d)

Поради това е възможно да се контролира времето на задържане на утайката и то да се поддържа на предварително определена стойност чрез контрол на дебита на изразходвана утайка Q_1.

Заключения

3. 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.

4. Като се нанесат стойностите на S_1 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 S_1, в зависимост от $S_1 \cdot \theta_S$.

Новата формулировка на уравнение [1] дава:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Ако K_d е малко, $1 + \theta_s \cdot K_d \sim 1$ и [5] приема вида:

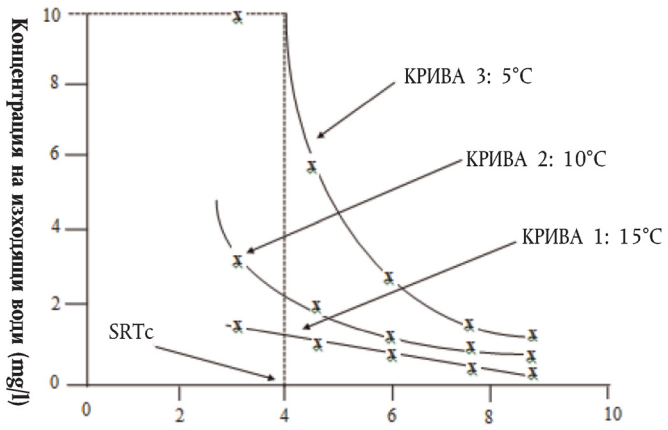
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

По този начин графиката трябва да е права линия (вж. фигура 2) с наклон $1/\mu_m$ и да пресича K_S/μ_m; а също $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

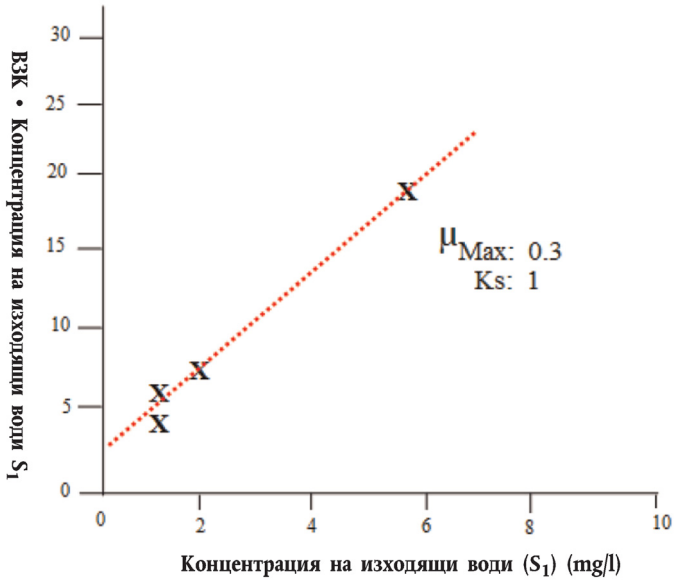
Фигура 1

Три температури; пет ВЗК



Фигура 2

Регресионна линия на ВЗК · S_1 по отношение на S_1 при T = 5 °C



Речник:

Концентрация на изходящи води:

Крива:

▼M4

Допълнение 7

ИЗПИТВАНЕ ПРИ НИСКА (μg/l) КОНЦЕНТРАЦИЯ

1. Нормалното съдържание на много химикали във водна среда, дори в отпадъчните води, е много ниско (μg/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 B.10-A), но само що се касае до първичната биоразградимост, като се използват подходящо ниски концентрации (< 100 μg/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 μg/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 B.12) и се захранва с изменени синтетични отпадъчни води по рецептурата на ОИСР или с битови отпадъчни води. Синтетичните отпадъчни води са с променен състав (поради променящата се стойност на pH и лошата утаимост 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 μg/l (т.е. приблизително до същата концентрация, която се използва в краткосрочното изпитване). веднъж седмично 10 % от общото количество утайка се заменя с прясна утайка с цел поддържане на балансирана микробна популация.

4. В началото и в края на аерирането се измерва концентрацията на изпитвания химикал и изпитването продължава, докато се постигне окончателно елиминиране на изпитвания химикал; процесът продължава от една седмица до няколко месеца.

Краткосрочно изпитване

5. Извършва се кратко изпитване (напр. 8 часа) с цел определяне на скоростната константа от (псевдо)първи порядък на разграждането на изпитвания химикал в активна утайка с известни, но различни произход и история. По-специално, пробите активна утайка са взети от реакторите за ПИАУ — след края на периода на аериране, когато концентрация на органичен субстрат е ниска — по време на експеримента за аклиматизиране (точки 3 и 4). Кал може да се вземе и от едновременно действащ модул за ПИАУ, в който не е добавен

▼M4

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 μg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851-864.

(5) Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (μg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711-735.

(6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, № 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

B.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 B.4 A до E 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 (B.10-A). 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 CO_2 в изпускания от модула газ.

4. Gloyna *et al.* (4) използват доста по-различен подход и изобретяват въртящ се тръбовиден реактор. Върху вътрешната повърхност на въртяща се тръба, по известната ѝ повърхнина, те отглеждат биофилм, като пропускат входящите води от горната страна на тръбата, наклонена под малък ъгъл спрямо хоризонталата. Реакторът е използван за изучаване на биоразградимостта на повърхностноактивни вещества (5), както и за проучване на оптималната дебелина на биофилма и на дифузията през филма (6). Същите автори разработват допълнително реактора, като включват възможност за определяне на CO_2 в изпусканите 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. Условията 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 B.10-A). Следва да са известни също и химичната структура, или поне емпиричната формула, за да се изчисляват теоретичните стойности и/или да се проверяват измерените стойности на параметрите, например теоретично потребният кислород (ТПК), DOC.

11. Информацията за токсичността на изпитвания химикал за микроорганизми (вж. допълнение 4 към глава B.10-A) може да бъде особено полезна при избирането на подходящи концентрации за изпитване и може да бъде съществена за правилното тълкуване при ниски стойности на биологичното разграждане.

ПРАГОВИ НИВА

12. Първоначално за пускането даден химикал на пазара се изискваше първичното биоразграждане на 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 пораждат. В множество изследвания на чисти химикали процентът на елиминиране на DOC достига до > 90 % при над три четвърти, и > 80 % при над 90 % от химикалите, които са показали някаква значима степен на биоразградимост.

РЕФЕРЕНТНИ ХИМИКАЛИ

13. За да се гарантира, че експерименталната процедура е правилно изпълнена, полезно понякога да се изпитват референтни химикали, чието поведение е известно. Сред тези химикали например са адипиновата киселина, 2-фенилфенолът, 1-нафтолът, дифеновата киселина и 1-нафтоената киселина.

ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

14. Относителното стандартно отклонение, определено от лаборатория в Обединеното кралство, възлизаше в рамките на изпитванията на 3,5 %, а между изпитванията — на 5 % (7).

▼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 бавновъртящ се двигател с регулируема скорост. Температурата на тръбите се контролира, като те се разполагат в помещение с постоянна температура.

16. Чрез разполагане на всяка тръба на реактора в запушена тръба с малко по-голям размер и осигуряване на херметичността на свръзките, излизащият CO_2 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. Близо 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/sec^2.

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,

— pH, 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 ОИСР. Поради това се препоръчва използването на битови отпадъчни води. Измерва се концентрацията на DOC (или ХПК) във всяка нова партида органична среда. Киселинността или алкалността на органичната среда следва да бъде известна. Средата може да наложи добавянето на подходящ буфер (натриев хидрогенкарбонат или калиев хидрогенфосфат), ако киселинността или алкалността е ниска, за да се поддържа pH от около 7,5 ± 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 ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), 4 mg; магнезиев сулфат хептахидрат, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 mg. Тези синтетични отпадъчни води по ОИСР са примерни; те осигуряват средна концентрация на DOC от около 100 mg/l. Вместо тях може да се използват води с друг състав с приблизително същата концентрация на DOC, които да са по-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 утаени отпадъчни води, събирани ежедневно от пречиствателни станции, приемащи 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 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, напр. чрез разреждане с чешмяна вода

Смазочно масло

25. За смазване на ролките на перисталтичната помпа може да се използва глицерин или маслинено 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 B.10-A. 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 pH на изходния разтвор. Получаването на екстремни стойности означава, че добавянето на химикала може да повлияе на pH на активната утайка в системата за изпитване. В този случай с малки количества неорганична киселина или основа се неутрализира стандартният разтвор до получаване на pH, равно на 7 ± 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/min. 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 ± 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 pH на изходящите води, по-специално ако се очаква нитрификация.

Проби и анализ

37. Методът, схемата и честотата на вземането на проби се избират с оглед на целта на изпитването. Например, вземат се на случаен принцип проби от входящите и от изходящите води, или се събират проби през по-дълъг период, напр. 3—6 часа. През първия период, преди добавянето на изпитвания химикал, проби се вземат два пъти седмично. Пробите се филтруват през мембрани или се центрофугират при около 40 000 m/sec^2 за около 15 min (точка 18). Може да се окаже необходимо пробите да се оставят да се утаят или да се филтруват през груб филтър преди филтруването с мембрана. Определя се DOC (или ХПК) най-малко два пъти и, ако е необходимо, също и БПК, амониеви йони и нитрити/нитрати.

38. Всички анализи се извършват възможно най–бързо след събирането и подготвянето на пробите. Ако се налага отлагане на анализите, пробите се съхраняват при около 4 °C на тъмно в пълни догоре и плътно запушени бутилки. Ако се налага пробите да се съхраняват повече от 48 часа, те трябва да се съхранят чрез дълбоко замразяване, ацидификация или чрез добавяне на подходящ токсичен химикал (напр. 20 ml/l разтвор на живачен(II) хлорид с концентрация 10 g/l). Трябва да се вземат мерки техниките за съхранение да не влияят върху резултатите на анализа.

Период на установяване

39. През този период биофилмът по повърхността расте и достига оптималната си дебелина, което обикновено отнема 2 седмици и не следва да продължава повече от 6 седмици. Елиминирането (точка 44) на DOC (или ХПК) се увеличава и достига стойност в платото. Когато е достигнато плато при сходни стойности в двете тръби, едната от тях се избира за контролна за оставащото време на изпитването, през което техните показатели следва да остават съизмерими.

Въвеждане на изпитвания химикал

40. На този етап 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 обхване най-малко два пълни цикъла на нарастване и отлепяне на филма.

ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

Обработка на резултатите

43. Изчислява се процентът на елиминиране на DOC (или ХПК) на изпитвания химикал за всяка предвидена във времето оценка, като се използва уравнението:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

където

D_t = процент на елиминиране на DOC (или ХПК) в момент t;

Cs = 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)

Eo = 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:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

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:

$$DST = 100\ (1 - S_e/S_i)\ \%$$

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 B.4 от настоящото приложение, Г, Д и Е) (9) или изпитване за измерване на отделянето на CO_2 (глава B.4-B 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, pH, 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 A-E.

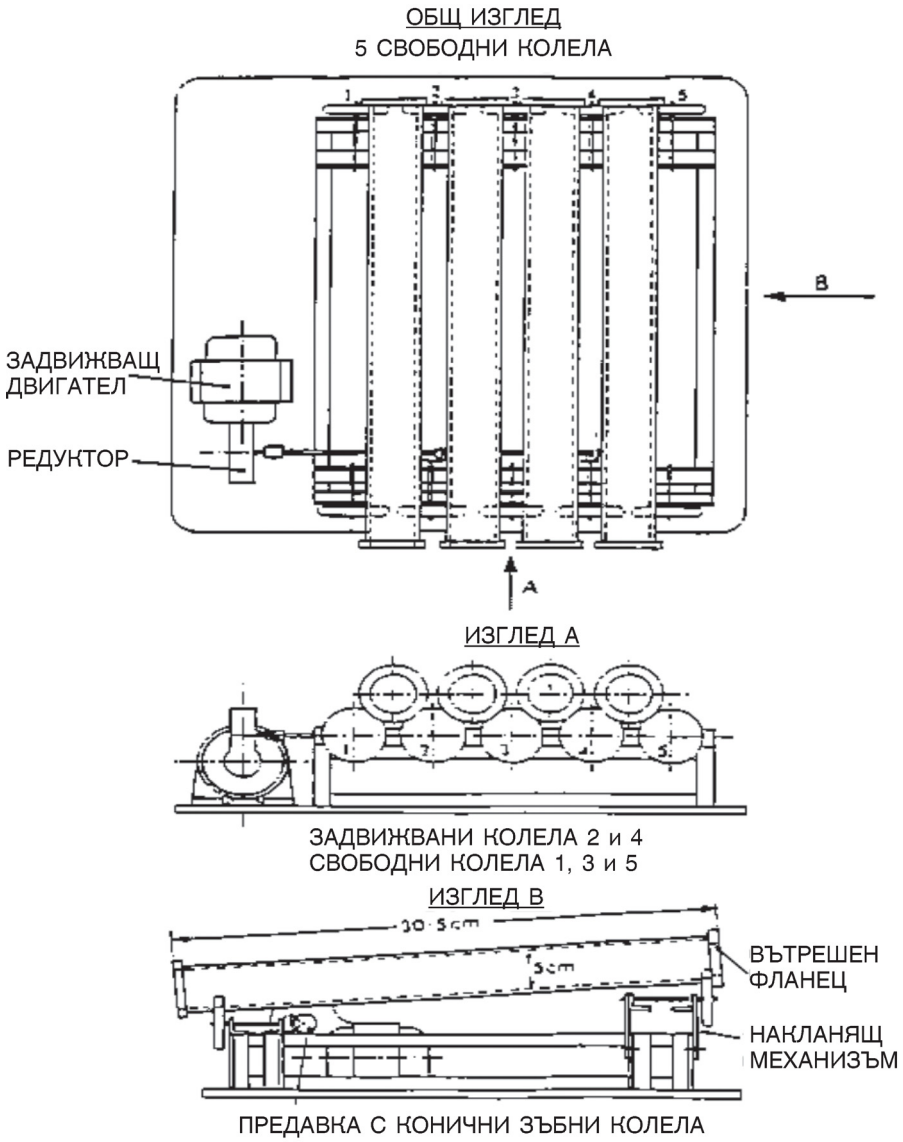
(10) ISO 14593 (1998). Качество на водата — Оценяване на крайната биоразградимост на органичните съединения във водна среда. Метод за изпитване с анализиране на освободения неорганичен въглерод в херметични съдове.

▼M4

Допълнение 8

Фигура 1

Въртящи се тръби



Речник:

Общ изглед:

Изглед A/B:

Задвижвани колела:

Свободни колела:

Задвижващ двигател:

Редуктор:

Вътрешен фланец:

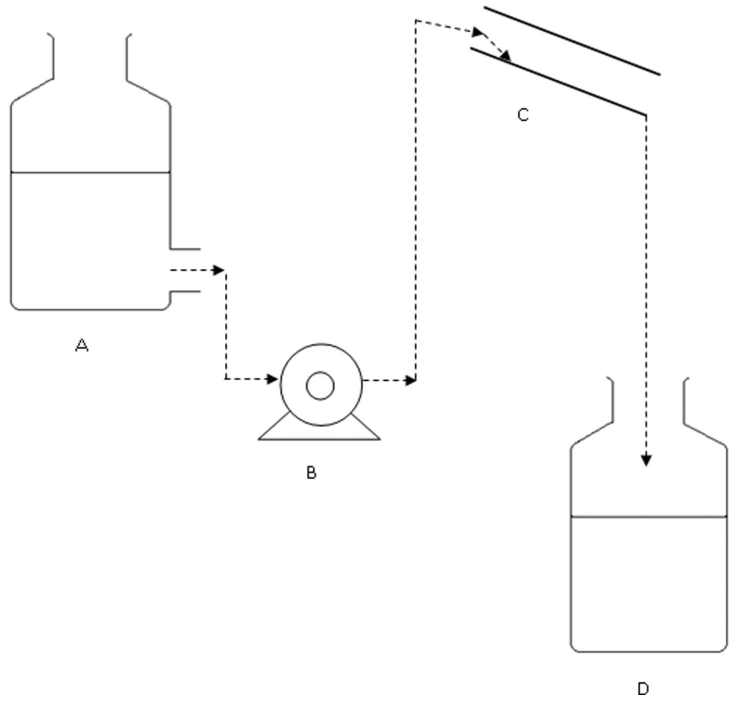
Накланящ механизъм:

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“.

▼B

В. 11. **БИОЛОГИЧНО РАЗГРАЖДАНЕ.**

ИЗПИТВАНЕ ЗА ПОТИСКАНЕ ДИШАНЕТО НА АКТИВИРАНА УТАЙКА

1. **МЕТОД**

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Описаният метод оценява ефекта на изпитваното вещество върху микроорганизмите посредством измерване на степента на дишане при дефинирани условия в присъствие на различни концентрации на изпитваното вещество.

Целта на този метод е да предостави бързо средство за пресяващо изпитване, при което веществата, можещи да окажат нежелано влияние върху станциите за биологично пречистване с аеробни микроорганизми, да бъдат идентифицирани, и да демонстрира подходящи непотискащи концентрации на изпитваните вещества, които да се използват при изпитванията за биологична разградимост.

Дефинитивното изпитване може да бъде предшествано от изпитване за определяне на диапазон. То дава информация за диапазона на концентрациите, които да се използват при основното изпитване.

В проекта за изпитването трябва да бъдат включени две контроли без изпитвано вещество, едната в началото и другата в края на експерименталната серия. Всяка партида активирана утайка трябва също да бъде проверена с помощта на вещество за сравнение.

Този метод най-лесно се използва с вещества, които поради своята разтворимост във вода и ниска летливост вероятно остават във водата.

За вещества с ограничена разтворимост в изпитваните среди може да не е възможно да се определи EC_{50}.

Резултатите, базирани на постъпването на кислород, могат да доведат до погрешни изводи, когато изпитваното вещество притежава склонност да разединява окислителното фосфорилиране.

За провеждането на изпитването е полезно да е налице следната информация:

— разтворимост във вода,

— парно налягане,

— структурна формула,

— чистота на изпитваното вещество.

Препоръка

Активираната утайка може да съдържа потенциално патогенни организми и с нея трябва да се работи внимателно.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ЕДИНИЦИ

Степента на дишане представлява кислородната консумация на микроорганизмите в аеробната утайка на отпадъчните води, изразена обичайно като mg O_2 за mg утайка за час.

▼B

За да се изчисли потискащият ефект на дадено изпитвано вещество при конкретна концентрация, степента на дишане се изразява като процент от средната стойност на двете контролни степени на дишане:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{процент потискане}$$

където:

R_s = степен на кислородна консумация при изпитваната концентрация на веществото,

R_{C1} = степен на кислородна консумация, контрола 1,

R_{C2} = степен на кислородна консумация, контрола 2,

EC_{50} при този метод представлява концентрацията на изпитваното вещество, при която дихателната степен е 50 % от тази, която е демонстрирана от контролата при условията, описани за този метод.

1.3. ВЕЩЕСТВА ЗА СРАВНЕНИЕ

Препоръчва се като вещество за сравнение да се използва 3,5-дихлорофенол, който е познат инхибитор на дишането, и да се изпитва за EC_{50} при всяка партида активирана утайка като средство за проверка дали чувствителността на утайката не е абнормна.

1.4. ПРИНЦИП НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

Дихателната степен на активираната утайка, захранена със стандартно количество синтетични отпадъчни води, се измерва след време на експозиция 30 минути или три часа, или и двете. Измерва се също и дихателната степен на същата активирана утайка в присъствие на различни концентрации на изпитваното вещество при иначе идентични условия. Потискащият ефект на изпитваното вещество при конкретна концентрация се изразява като процент от средните дихателни степени на двете контроли. Стойност EC_{50} се изчислява от измерванията при различни концентрации.

1.5. КРИТЕРИИ ЗА КАЧЕСТВО

Резултатите от изпитването са валидни, ако:

— дихателните степени на двете контроли не се различават помежду си с повече от 15 %,

— стойността EC_{50} (30 минути и/или три часа) за 3,5-дихлорофенол е в рамките на приетия диапазон 5 до 30 mg/l.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА ЗА ИЗПИТВАНЕ

1.6.1. *Реактиви*

1.6.1.1. Разтвори на изпитваното вещество,

Разтворите на изпитваното вещество са прясно приготвени в началото на изпитването, като се използва изходен разтвор. Подходящ е изходен разтвор с концентрация 0,5 g/l, ако се спазва препоръчаната по-долу процедура.

▼B

1.6.1.2. Разтвор на контролно вещество

Например, разтвор на 3,5-дихлорофенол може да бъде приготвен чрез разтваряне на 0,5 g 3,5-дихлорофенол в 10 ml lMNaOH, разреждане до приблизително 30 ml с дестилирана вода, добавяне при едновременно разбъркване на 0,5 M H_2SO_4 до започване на преципитация — ще бъдат необходими приблизително 8 ml 0,5 M H_2SO_4 — и накрая разреждане на сместа до един литър с дестилирана вода. pH трябва да бъде в диапазона от 7 до 8.

1.6.1.3. Синтетични отпадъчни води

Захранване със синтетични отпадъчни води се прави чрез разтваряне на следните количества вещества в един литър вода:

— 16 g пептон,

— 11 g месен екстракт,

— 3 g урея,

— 0,7 g NaCl,

— 0,4 g $CaCl_2.2H_2O$,

— 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$,

— 2,8 g K_2HPO_4.

Забележка 1: Синтетичната отпадъчна вода представлява 100-кратен концентрат на този, който е посочен в Техническия доклад на ОИСР от 11 юни 1976 г.„Предложение за метод за определяне на биологичната разградимост на сърфактанти, използвани в синтетичните детергенти“, с добавка на дикалиев хидроген фосфат.

Забележка 2: Ако приготвената среда не се използва веднага, тя се съхранява на тъмно при температура от 0 до 4 °C за не по-дълго от една седмица при условия, които не водят до никаква промяна в нейния състав. Преди съхранението средата може да бъде и стерилизирана или пептонът и месният екстракт могат да бъдат добавени малко преди провеждането на изпитването. Преди употреба тя трябва да бъде щателно смесена и pH да бъде коригирано.

1.6.2. *Апаратура*

Апаратура за измерване: Точното проектиране не е от голямо значение. Трябва обаче да има пространство между капака на съда и водното ниво и сондата трябва да се поставя плътно в шийката на измервателната колба.

Необходимо е обичайно лабораторно оборудване, и по-конкретно следното:

— апаратура за измерване,

— устройство за аериране,

— pH-електрод и устройство за измерване,

— O_2-електрод.

1.6.3. *Приготвяне на проба за инокулиране*

Като микробна проба за инокулиране за изпитването се използва активирана утайка от пречиствателна станция, третираща главно битови отпадъчни води.

Ако е необходимо, при връщане в лабораторията едрите частици могат да бъдат отстранени чрез краткотрайно утаяване, например за 15 минути, и отливане на горния слой по-фини твърди частици, който ще се използва. Алтернативно, утайката може да бъде смесена с помощта на миксер за няколко секунди.

▼B

Ако се смята, че съществува потискащ материал, утайката допълнително трябва да бъде измита с чешмяна вода или изотоничен разтвор. След центрофугиране надстоящата течност се отлива (тази процедура се повтаря три пъти).

Малко количество утайка се претегля и се изсушава. От този резултат може да се изчисли количеството на влажната утайка, която трябва да бъде суспендирана във водата, за да се получи активирана утайка със суспендирани в смесената течност твърди частици в рамките на диапазона между 2 и 4 g/l. Това ниво дава концентрация в експерименталната среда между 0,8 и 1,6 g/l, ако се спазва процедурата, препоръчана по-долу.

Ако утайката не може да се използва в деня на вземането, към всеки литър активирана утайка, приготвена, както е посочено по-горе, се добавят по 50 ml синтетична отпадъчна вода. След това тя се аерира една цяла нощ при температура 20 ± 2 °C. След това се аерира за използване през деня. Ако е необходимо, преди използване pH се проверява и коригира на pH от 6 до 8. Суспендираните твърди частици в смесената течност трябва да бъдат определени, както е описано в предишния абзац.

Ако през следващи дни трябва да се използва същата партида активирана утайка (максимум четири дни), в края на всеки работен ден се добавят допълнително по 50 ml синтетични отпадъчни води на литър утайка.

1.6.4. *Провеждане на изпитването*

Продължителност/време на експозиция:	30 минути и/или три часа, по време на които се провежда аериране
Вода:	Питейна вода (ако е необходимо, дехлорирана)
Снабдяване с въздух:	Чист, обезмаслен въздух. Въздушен дебит 0,5 до 1 l/min
Апаратура за измерване:	Колба с плоско дъно, например колба за определяне на БПК (биологична потребност от кислород)
O_2-метър:	Подходящ кислороден електрод със записващо устройство
Хранителен разтвор:	Синтетични отпадъчни води (вж. по-горе)
Изпитвано вещество:	Експерименталният разтвор е прясно приготвен в началото на изпитването.
Вещество за сравнение:	Например 3,5-дихлорофенол (най-малко три концентрации)
Контроли:	Инокулирана проба без изпитвано вещество
Температура:	20 ± 2 °C.

По-долу е дадено предложение за експериментална процедура, която може да бъде следвана както за изпитваното, така и за веществото за сравнение по време на тричасовия период на експозиция:

Използват се няколко съда (например няколко еднолитрови мерителни чаши).

Трябва да се използват най-малко пет концентрации, различаващи се помежду си с постоянен фактор, за предпочитане непревишаващ 3,2.

Във времето „0“ 16 ml синтетична отпадъчна вода се допълват с вода до 300 ml. Добавят се 200 ml микробна проба за инокулиране и цялата смес (500 ml) се излива в първия съд (първа контрола C_1).

▼B

Експерименталните съдове трябва да се аерират непрекъснато, така че разтвореният O_2 да не спада под 2,5 mg/l и непосредствено преди измерването на дихателната степен концентрацията на O_2 да бъде около 6,5 mg/l.

Във времето „15 минути“ (15 минути е произволен, но удобен интервал) горната процедура се повтаря с изключение на това, че 100 ml от изходния разтвор на изпитваното вещество се добавят към 16 ml синтетична отпадъчна вода преди добавяне на вода до 300 ml и микробната проба за инокулиране, така че да се получи обем от 500 ml. Тази смес после се излива във втори съд и се аерира както по-горе. Този процес се повтаря през 15-минутни интервали с различни обеми от изходния разтвор на изпитваното вещество, за да се получи серия от съдове, съдържащи различни концентрации от изпитваното вещество. Накрая се приготвя втора контрола (C_2).

След три часа се регистрира pH и добре размесена проба от съдържанието на първия съд се излива в апаратурата за измерване и се измерва дихателната степен за период с продължителност до 10 минути.

Това определяне се повтаря със съдържанието на всеки съд на 15-минутни интервали по такъв начин, че времето на експозиция за всеки съд да е три часа.

Веществото за сравнение се изпитва за всяка партида микробни проби за инокулиране по същия начин.

Когато измерванията се правят след 30-минутна експозиция, е необходим различен режим (т.е. повече от един O_2-метър).

Ако е необходимо измерване на химичната консумация на кислород, приготвят се допълнителни съдове, съдържащи изпитваното вещество, подхранване със синтетични отпадъчни води и вода, но не и активирана утайка. Кислородната консумация се измерва и се регистрира след аериране в продължение на 30 минути и/или три часа (време на експозиция).

2. **ДАННИ И ОЦЕНКА**

Дихателната степен се изчислява от записа между приблизително 6,5 mg/l O_2 и 2,5 mg/l O_2, или за 10-минутен период, когато дихателната степен е ниска. Частта на дихателната крива, върху която се измерва дихателната степен, трябва да бъде линейна.

Ако дихателните степени на двете контроли не се различават с повече от 15 % една от друга или ако EC_{50} (30 минути и/или три часа) на веществото за сравнение не е в приетия диапазон (от 5 до 30 mg/l за 3,5-дихлорофенол), изпитването е невалидно и трябва да бъде повторено.

Процентът на потискане се изчислява за всяка изпитвана концентрация (вижте 1.2). Построява се крива на процента на потискане срещу концентрацията на нормална логаритмична хартия (или логаритъма на вероятността) и се извежда стойността на EC_{50}.

Като се използват стандартни процедури, могат да се определят 95 % граници на доверителност за стойностите на EC_{50}.

▼B

3. **ОТЧИТАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Ако е възможно, протоколът от изпитването съдържа следното:

— изпитвано вещество: данни за химическо идентифициране,

— експериментална система: източник, концентрация и всяко предварително третиране на активираната утайка,

— условия на изпитване,

  — pH на реакционната смес преди измерване на дишането,

  — експериментална температура,

  — продължителност на изпитването,

  — вещество за сравнение и неговата измерена EC_{50},

  — абиотично постъпване на кислород (ако има).

— резултати:

  — всички измерени данни,

  — крива на потискане и метод за изчисляване на EC50,

  — EC_{50} и, ако е възможно, граници на доверителност 95 %, EC_{20} и EC_{80}

  — всички наблюдения и всички отклонения от този метод за изпитване, които може да са оказали влияние върху резултата.

3.2. ТЪЛКУВАНЕ НА ДАННИТЕ

Стойността EC_{50} трябва да се възприема просто като едно ръководство за вероятната токсичност на изпитваното вещество при пречистване на активирана отпадъчна утайка или за микроорганизмите в отпадъчните води, тъй като сложните взаимодействия, възникващи в околната среда, не могат да бъдат точно симулирани при лабораторно изпитване. Допълнително, при изпитваните вещества, които могат да имат потискащ ефект върху окислението на амония, също могат да се получат атипични криви на потискане. Съответно, такива криви трябва да бъдат интерпретирани внимателно.

4. **ПОЗОВАВАНИЯ**

(1) Международен стандарт ISO 8192-1986.

(2) Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, стр. 165.

(3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, стр. 245.

(4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method No 103,* also described by:

(5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, стр. 80.

(6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 1977, стр. 247.

(7) ОИСР, Париж, 1981, *Test Guideline 209,* Решение на Съвета C(84) 30 final.

▼B

B.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 °C. 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 разграждат 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 $C_{общ} - C_{неорганичен.}$

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.

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \qquad [1]$$

където

D_{da} = разграждане/ежедневно добавяне.

2. Процентното отнемане D_{ssd} на количеството вещество, в наличност в началото на всеки ден:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (а)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ (б)]$$

където

D_{ssd} = разграждане/вещество в началото на деня;

индексите i и (i + 1) се отнасят до деня на измерването.

Уравнението 2(а) 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 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 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 всека 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 $^{14}CO_2$ 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) ОИСР, Париж, 1981, *Test Guideline 302 A,* Решение на Съвета C(81) 30 окончателен.

▼B

Допълнение 1

SCAS изпитване: примерни резултати

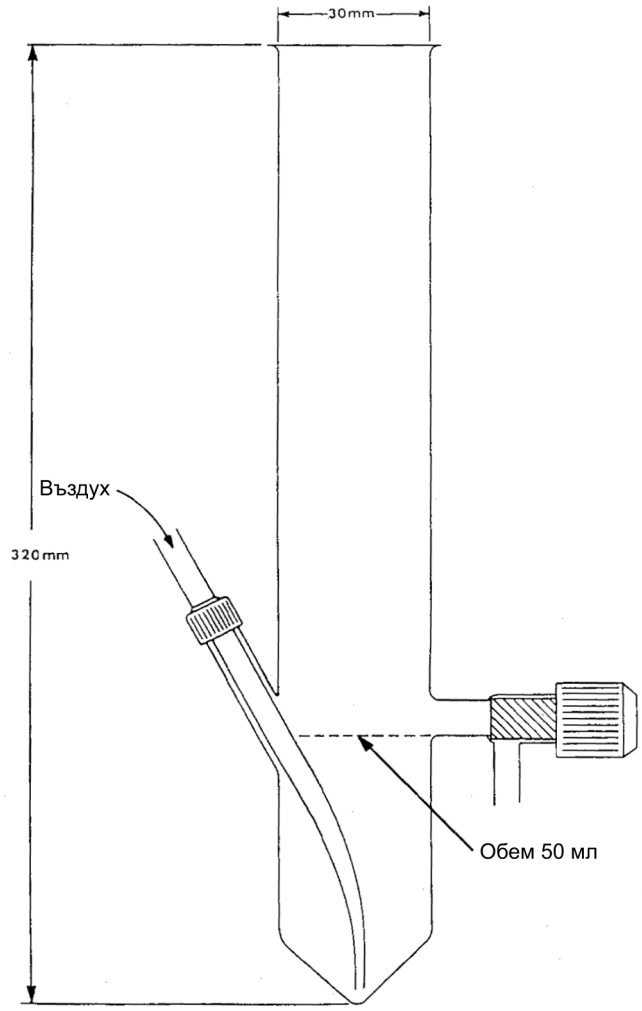
Вещество	C_T (mg/l)	c_t—c_c (mg/l)	Процент на биологично разграждане D_{da}	Продължителност на изпитването, (дни)
4-ацетрил-аминобензен	17,2	2,0	85	40
Тетра-пропилен бензен	17,3	8,4	51,4	40
4-нитрофенол	16,9	0,8	95,3	40
Диетилен гликол	16,5	0,2	98,8	40
Анилин	16,9	1,7	95,9	40
Циклопентан тетра карбоксилат	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Допълнение 2

Примерна експериментална апаратура

Фигура 1



▼B

B.13. **БИОКОНЦЕНТРАЦИЯ: ПРОТОЧЕН ТЕСТ ВЪРХУ РИБИ**

1. **МЕТОД**

Настоящият метод на биоконцентрация е точно копие на OECD TG 305 (1996 г.).

1.1. УВОД

Настоящият метод описва процедура за охарактеризиране на биоконцентрационния потенциал на вещества в риба при проточни условия. Въпреки че проточните тестови режими са за предпочитане, полустатичните режими също са допустими, при условие че са удовлетворени критериите за валидност.

Методът дава достатъчно подробности за извършване на теста, като същевременно допуска задоволителна свобода за адаптиране на експерименталния проект към условията в отделните лаборатории и по отношение на променящите се характеристики на тестовите вещества. Той се прилага най-успешно при стабилни органични химикали със стойности log P_{ow} между 1,5 и 6,0 (1), но може да се прилага към суперлипофилни вещества (с log P_{ow} > 6,0). Предварителната оценка на коефициента на биоконцентрация (BCF), понякога отбелязван като K_B, за такива суперлипофилни вещества вероятно ще бъде по-голяма от стойността на коефициента на биоконцентрация в устойчиво състояние (BCF_{SS}), която се очаква при лабораторни експерименти. Предварителните оценки на коефициента на биоконцентрация за органични химикали с log P_{OW}-стойности до около 9,0 могат да се получат чрез използване на уравнението на Bintein at al (2). Параметрите, които характеризират биоконцентрационния потенциал, включват константата на скорост на поглъщане (k_1), константата на скорост на очистване (k_2) и BCF_{SS}.

Радиомаркираните тестови вещества могат да улеснят анализа на водата и на пробите риба и могат да се използват за определяне на това, дали да се прави идентификация за изграждане и количествена оценка. Ако се измерят общите радиоактивни отпадъци (например чрез изгаряне или разтваряне на тъкани), то BCF се базира на основното съединение, на всички задържани метаболити, а също и на асимилирания въглерод. Коефициентите BCF, базирани на общите радиоактивни отпадъци, могат следователно да се сравняват директно с BCF, получен при специфичен химически анализ само на основното съединение.

При радиомаркирани изследвания може да се използват процедури за очистване, за да се определи BCF, базиран на основното съединение, а главните метаболити се охарактеризират, ако се сметне за необходимо. Възможно е също да се комбинира изследване на метаболизма при рибите с изследване на биоконцентрацията, чрез анализ и идентификация на отпадъците в тъканите.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ЕДИНИЦИ

Биоконцентрация/биоакумулиране е увеличението в концентрацията на тестовото вещество във или върху организъм (определени негови тъкани), отнесено към концентрацията на тестовото вещество в заобикалящата среда.

Коефициентът на биоконцентрация (BCF или K_B) по всяко време на фазата на поглъщане в този акумулиращ тест е концентрацията на тестовото вещество във/върху рибата или определени нейни тъкани (C_f като μg/g (ppm), разделено на концентрацията на химикала в окръжаващата среда (C_w като μg/ml (ppm).

▼B

Коефициент на биоконцентрация в устойчиво състояние (BCF_{SS} или K_B) не се променя съществено за дълъг период от време, като концентрацията на тестовото вещество в окръжаващата среда през този период е константа.

Равна линия (плато), или *устойчиво състояние* на графиката на тестовото вещество в рибата (C_f) спрямо времето, се достига, когато кривата стане успоредна на времевата ос и са направени три успешни анализа на C_f на проби, взети на интервали от поне два дни, които три анализа не се отличават с повече от ± 20 % един от друг, и няма никакви съществени разлики между трите периода на вземане на проба. Когато се анализират обединени проби, са необходими поне четири успешни анализа. За тестови вещества, които са взети бавно, е по-подходящо интервалите да бъдат по седем дни.

Коефициентите на биоконцентрация, изчислени директно от константите на кинетичната скорост (k_1/k_2), се определят като кинетичен коефициент на концентрация, BCF_k.

Коефициентът на разпределение октанол-вода (P_{ow}) е съотношението на химичната разтворимост в n-октанол и водата при равновесно състояние (метод A.8), изразяван също като K_{ow}. Логаритъмът от P_{ow} се използва като индикация на химичния потенциал за биоконцентрация при водни организми.

Фазата на излагане или поглъщане е времето, през което рибата е изложена на въздействието на тестовия химикал.

Константата на скорост на поглъщане (k_1) е цифровата стойност, определяща скоростта на нарастване на концентрацията на тестовото вещество във/върху рибата, подложена на теста (или определени нейни тъкани), когато рибата е изложена на въздействието на този химикал (k_1 се изразява в ден$^{-1}$).

Фазата след излагането или очистването (загуба) е времето, което следва след прехвърлянето на тестовата риба от среда, съдържаща тестово вещество, към среда, несъдържаща такова вещество, през което време се изследва очистването (или нетната загуба) на веществото от тестовата риба (или определени нейни тъкани).

Константа за скорост на очистването (загуба) (k_2) е цифровата стойност, определяща скоростта на намаляване на концентрацията на тестовото вещество в тестовата риба (или определени нейни тъкани), следваща прехвърлянето на тестовата риба от среда, съдържаща тестово вещество, към среда, несъдържаща такова вещество (k_2 се изразява в ден$^{-1}$).

1.3. ПРИНЦИП НА ТЕСТОВИЯ МЕТОД

Тестът се състои от две фази: фаза на излагане на въздействие (поглъщане) и фаза след излагане (очистване). По време на фазата на поглъщането отделни групи риба от един вид се излагат на поне две концентрации на тестовото вещество. След това те се прехвърлят в среда, несъдържаща тестово вещество. Фазата на очистването е необходима винаги, освен ако поглъщането на веществото по време на тази фаза е незначително (например BCF е по-малко от 10). Концентрацията на тестовото вещество във/върху рибата (или определени нейни тъкани) се проследява по време на двете фази на теста. Освен двете тестови концентрации, една контролна група риби се държи при идентични условия с изключение на отсъствието на тестово вещество, за да се отнесат възможните странични ефекти, наблюдавани при теста за биоконцентрация, към съответната контролна група и да се получат концентрации за тестовото вещество.

▼B

Фазата на поглъщането протича 28 дни, освен ако не се установи, че равновесието е достигнато по-рано. Предвиждане за дължината на фазата на поглъщането и времето за достигане на устойчиво състояние може да се направи на база уравнението от приложение 3. След това започва периодът за очистване, като рибата се прехвърля към същата среда, но без тестово вещество, в друг чист съд. Когато е възможно, коефициентът на биоконцентрация се изчислява, за предпочитане както чрез съотношението (BCF_{SS}) на концентрацията на рибата (C_f) и във водата (C_w) при видимо устойчиво състояние, така и като коефициент за кинетична биоконцентрация (BCF_k), като съотношение на константите на скоростта на поглъщането (k_1) и очистването (k_2), приемайки кинетика от първи ред. Ако не се получава с кинетика от първи ред, се използват по-сложни модели (приложение 5).

Ако устойчивото състояние не се постигне за 28 дни, фазата на поглъщането се удължава, докато се постигне устойчиво състояние, или за още 60 дни, в зависимост от това кое ще се случи по-напред; след това започва фазата на очистването.

Константите на скоростта на поглъщането, на очистването (загуба) (или константите, при които се използват по-сложни модели), коефициентът на биоконцентрация и, когато е възможно, доверителните граници на всеки един от тези параметри се изчисляват от модела, който най-добре описва измерените концентрации на тестовото вещество в рибата и водата.

BCF се изразява като функция на общото мокро тегло на рибата. За специални цели обаче определени тъкани или органи (например мускули, черен дроб) могат да се използват, 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 липофилността, то има също и съответна връзка между липидното съдържание на тестовата риба и наблюдаваната биоконцентрация на такива вещества. Следователно, за да се намали този източник на променливост в тестовите резултати за веществата с висока липофилност (т.е. с $\log P_{ow} > 3$), биоконцентрацията се изразява по отношение на липидно съдържание като допълнение към цялото телесно тегло.

Липидното съдържание се определя върху същия биологичен материал, който се използва за определяне на концентрацията на тестовото вещество, когато това е възможно.

1.4. ИНФОРМАЦИЯ ЗА ТЕСТОВОТО ВЕЩЕСТВО

Преди провеждането на теста за биоконцентрация трябва да се знае следната информация за тестовото вещество:

— разтворимост във вода;

— коефициент на разпределение октанол-вода P_{ow} (обозначаван също като K_{ow}, определен чрез HPLC метода в A.8);

— хидролиза;

— фототрансформация във вода, определена при слънчево лъчене или при условия, симулиращи слънчево лъчене, и при условия на лъчене на теста за биоконцентрация (3);

▼B

— повърхностно напрежение (т.е. за вещества, при които log P_{ow} не може да се определи);

— парно налягане;

— готово биологично разграждане (когато е уместно).

Друга необходима информация е токсичността към рибните видове, която се използва в теста, за предпочитане асимптотичен LC_{50} (т.е. независим по време). Необходими са подходящ аналитичен метод, с позната точност, прецизност и чувствителност, за количественото определяне на тестовото вещество в тестовите разтвори и биологичен материал, заедно с подробности за подготовката на пробата и нейното съхранение. Аналитичната граница за детекция на тестовото вещество както във вода, така и в рибните тъкани, трябва също да се познават. Когато се използва ^{14}C маркирано тестово вещество, трябва да се знае процентът радиоактивност, свързан с примесите.

1.5. ВАЛИДНОСТ НА ТЕСТА

За да бъде валиден един тест, трябва да се прилагат следните условия:

— температурното колебание да е по-малко от ± 2°C,

— концентрацията на разтворения кислород да не пада под 60 % насищане,

— концентрацията на тестовото вещество в камерите да се поддържа в рамките на ±20 % от усреднените величини на измерените стойности по време на фазата на поглъщане,

— смъртността или други странични ефекти/болести както в контролната, така и в обработваната риба да е по-малка от 10 % в края на теста; когато тестът продължи повече от няколко седмици или месеци, смъртността или други странични ефекти в двата комплекта риба да е по-малка от 5 % за месец и да не превишава общо 30 %.

1.6. ЕТАЛОННИ СЪЕДИНЕНИЯ

Използването на еталонни съединения с познат биоконцентрационен потенциал би било полезно при проверката на експерименталната процедура, когато е необходимо. Специфични вещества обаче все още не могат да се препоръчат.

1.7 ОПИСАНИЕ НА ТЕСТОВИЯ МЕТОД

1.7.1. *Апаратура*

Трябва внимателно да се избягва използването на материали за всички части от оборудването, които могат да разтворят, абсорбират или разтопят и да окажат страничен ефект върху рибата. Могат да се използват стандартни правоъгълни или цилиндрични резервоари, изработени от химически инертен материал, с подходящ обем спрямо скоростта на зареждане. За предпочитане е да се използва Teflon (R), неръждаема стомана и/или стъклени тръби, а използването на тръби от мека пластмаса да се ограничи до минимум. Опитът показва, че за вещества с високи коефициенти на абсорбция, като синтетични пиретроиди например, може да се изисква използването на силикатни стъкла. В такива ситуации оборудването трябва да се изхвърли след употреба.

▼B

1.7.2. *Вода*

Обикновено в теста се използва натурална вода, която се взема от незамърсен източник с постоянно качество на водата. Водата за разреждане трябва да има качество, което да позволява оцеляването на избраните видове риба за периодите на аклиматизация и тест, без те да показват необичаен външен вид или поведение. В идеалния случай трябва да се демонстрира, че тестовите видове могат да оцеляват, да растат и да се възпроизвеждат в разреждащата вода (например в лабораторна култура или тест за токсичност при жизнен цикъл). Водата трябва да се характеризира поне чрез pH, твърдост, общо съдържание на твърди частици, общо съдържание на органичен въглерод и, за предпочитане, амониеви йони, нитрит и алкалност, а за морските видове — и соленост. Параметрите, които са важни за оптималното физическо състояние, са напълно известни, но приложение 1 дава препоръчителните максимални концентрации за определен брой параметри за тест при сладководни басейни и морски води.

Водата трябва да има постоянно качество по време на целия период на теста. Нейната pH трябва да е в границите от 6,0 до 8,5, но по време на даден тест тя трябва да е в границите на ± 0,5 pH единици. С цел да се обезпечи, че разреждащата вода няма да повлияе прекомерно върху резултата от теста (например чрез образуване на комплексни съединения с тестовото вещество) или да окаже странично въздействие върху качествата на семейството риби, на определени интервали трябва да се вземат проби за анализ. Определянето на тежки метали (например Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), главни аниони и катиони, (например Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), пестициди (например общо органофосфорни и общо органохлорни пестициди), общо органичен въглерод и суспендирали твърди частици трябва да се прави, например, на всеки три месеца, когато се знае, че разреждащата вода има относително постоянно качество. Ако се установи, че качеството на водата е постоянно за период от поне една година, тези определяния могат да се правят по-рядко и интервалите да се удължат (примерно на всеки шест месеца).

Съдържанието на природни частици, а също и общото съдържание на органичен въглерод (TOC) на разредената вода трябва да е възможно най-ниско, за да се избегне абсорбция на органична материя от тестовото вещество, която може да намали неговата биологична степен на абсорбция (4). Максимално допустимата стойност е 5 mg/l за определено конкретно вещество (сухо вещество, непреминаващо през 0,45 μm филтър) и 2 mg/l за общото количество органичен въглерод (вж. приложение 1). Ако е необходимо, водата се филтрира преди употреба. Приносът на органичния въглерод във водата от тестовата риба (екскрети) и от хранителните остатъци трябва да е възможно най-нисък. По време на теста концентрацията на органичен въглерод в тестовия съд не трябва да превишава концентрацията на органичен въглерод, получаван от тестовото вещество, и на разтварящия агент, ако се използва такъв, с повече от 10 mg/l (± 20 %).

1.7.3. *Тестови разтвори*

Приготвя се основен разтвор от тестовото вещество в подходяща концентрация. Той се приготвя чрез просто смесване или разбъркване на тестовото вещество в разреждаща вода. Не се препоръчва употребата на разтворители или диспергиращи агенти (разтварящи агенти); това обаче може да се получи в някои случаи с цел да се направи подходящо концентриран основен разтвор. Могат да се използват следните разтворители: етанол, метанол, етиленгликол монометилетер, етиленгликол диметилетер, диметилформамид и триетиленгликол. Като диспергиращи агенти могат да се използват Cremophor RH40, Tween 80, метилцелулоза 0,01 % и HCO-40. Трябва да се внимава, когато се използват агенти с лесно биоразграждане, тъй като те могат да причинят проблеми при бактериалния растеж в проточните тестове. Тестовото вещество може да бъде радиомаркирано и трябва да има най-голямата чистота (например за предпочитане > 98 %).

▼B

За проточни тестове се изисква система, която непрекъснато дозира и разрежда основен разтвор от тестовото вещество (например дозираща помпа, пропорционален разредител, система за насищане) и го изпраща към тестовите камери. Допускат се поне пет замествания на обема на ден през всяка тестова камера. Проточният метод е за предпочитане, но където това не е възможно (например когато тестовите организми са подложени на неблагоприятно въздействие), може да се използва полустатичната техника, при условие че са удовлетворени критериите за валидност. Дебитите на основните разтвори и разреждащата вода се проверяват 48 часа преди теста и след това поне веднъж на ден по време на теста. Тази проверка включва определянето на дебита през всяка камера и следенето да не варира с повече от 20 % както във, така и извън камерите.

1.7.4. *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 гледат в лабораторни условия. Другите критерии при избора на видове риба включват развлекателното, търговското и екологичното значение, а също и сравнима чувствителност, успешна употреба в миналото и т.н.

Препоръчваните видове риба са дадени в приложение 2. Могат да се използват и други видове, но може да се наложи адаптиране на тестовата процедура за постигане на подходящи тестови условия. В този случай се докладват обосновката за избора на видовете и експерименталният метод.

1.7.5. *Хващане на рибата*

Аклиматизирайте основната популация риба за поне две седмици във вода при тестова температура и я хранете достатъчно добре, на същия хранителен режим, на който ще бъде и по време на теста.

След 48-часов период се отчита смъртността и се прилагат следните критерии:

— при смъртност, по-голяма от 10 % за седем дни: откажете цялата партида,

— при смъртност между 5 и 10 % за седем дни: аклиматизирайте още седем дни,

— при смъртност, по-малка от 5 % за седем дни: приемете партидата; ако смъртността през втората седмица надвиши 5 %, откажете цялата партида.

Уверете се, че рибата, която използвате при тестовете, не страда от видими болести и отклонения. Изхвърлете болната риба. Рибата не трябва да бъде лекувана от болести две седмици преди теста или по време на теста.

▼B

1.8. ИЗВЪРШВАНЕ НА ТЕСТА

1.8.1. *Предварителен тест*

Би било полезно да се извърши един предварителен експеримент с цел да се оптимизират тестовите условия на окончателния тест, например изборът на концентрация(и) на тестовото вещество, продължителност на фазите на поглъщане и очистване.

1.8.2. *Условия на експозиция*

1.8.2.1. Продължителност на фазата на поглъщане

Предвиждане за продължителността на фазата на поглъщане може да се направи на база практически опит (например от предишно изследване или химикал, свързан с акумулиране) или от определени емпирични взаимовръзки, използващи познания относно водоразтворимостта или коефициента на разпределение на октанол/вода на тестовото вещество (вж. приложение 3).

Фазата на поглъщане трае 28 дни, освен ако не се установи, че равновесието е постигнато по-рано. Ако устойчивото състояние не се постигне за 28 дни, фазата на поглъщане трябва да се удължи, докато се постигне устойчиво състояние или с още 60 дни, в зависимост от това кое ще се случи по-напред.

1.8.2.2. Продължителност на фазата на очистването

Обикновено, за да се получи подходящо (например 95 %) намаляване на веществото в тялото на рибата (вижте приложение 3 за обяснение на оценката), е необходим период от време на половината от периода на поглъщане. Ако времето, необходимо за да се постигне 95 % загуба, е прекалено дълго, превишаващо два пъти нормалната продължителност на фазата на поглъщане (т.е. повече от 56 дни), може да се използва по-къс период (т.е. докато концентрацията на тестовото вещество стане по-малко от 10 % от концентрацията в устойчиво състояние). Обаче за вещества, които имат по-сложни схеми на поглъщане и очистване, отколкото са тези, представени чрез модел риба от една категория, даващи кинетика от първи ред, трябва да се оставят по-дълги фази на очистване за да се определят константите за загуба на скорост. Периодът може да се регулира чрез периода, през който концентрацията на тестовото вещество в рибата остава над аналитичния лимит на детекция.

1.8.2.3. Брой на тестовите риби

Подберете такъв брой риби за теста, че да има минимум по 4 риби за проба при всяко вземане на проба. Ако са необходими повече статистически данни, ще трябват и повече риби за проба.

Ако се използват възрастни риби, отчетете какви се използват в експеримента — мъжки, женски или смесени. Ако се използват риби и от двата пола, разликите в липидното съдържание между половете се документира като незначително преди началото на излагането; може би ще е необходимо събирането на мъжките и женските риби.

▼B

За всеки един тест се избират риби с близко тегло, така че най-малките да не са по-малки от две трети 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 понякога оказва значително влияние върху BCF-стойностите (1), тези подробности се записват акуратно. Препоръчва се по-малка проба риби да се измери преди теста, за да се прецени средното тегло.

1.8.2.4. Зареждане

Използват се високи съотношения вода към риба, за да се намали до минимум намаляването на C_w, причинено от прибавянето на риба в началото на теста, а също за да се избегне намаляване на концентрацията на разтворения кислород. Важно е скоростта на зареждане да е подходяща спрямо използваните видове за теста. При всички случаи скорост на зареждане от 0,1 до 1,0 g риба (мокро тегло) за литър вода на ден е нормално препоръчваната скорост. По-високи скорости могат да се използват, ако се установи, че желаната концентрация на тестовото вещество може да се поддържа в рамките на ± 20 % и че концентрацията на разтворения кислород не пада под 60 % насищане.

При подбора на подходящи режими на зареждане се отчита нормалният хабитат на рибите. Например дънните риби може да изискват повече място на дъното на аквариума за същия обем вода в сравнение с пелагичните видове.

1.8.2.5. Хранене

По време на аклиматизационния и тестовия период хранителният режим на рибата е на база познато съдържание на липиди и протеини при количество, достатъчно да я поддържа здрава и да запазва теглото ѝ. През тези периоди рибата дневно се храни с количества от 1 до 2 % от телесеното ѝ тегло; това поддържа липидната концентрация на постоянно ниво по време на теста при повечето видове риби. Количеството храна се преизчислява, например веднъж седмично, за да може да се поддържа постоянно телесно тегло и липидно съдържание. За целите на това изчисление теглото на рибата във всяка тестова камера се пресмята на база теглото на рибата, тествана напоследък в тази камера. Не претегляйте теглото на рибата, останала в камерата.

Неконсумираната храна и изпражненията се източват ежедневно от камерите малко след храненето (30 минути до 1 час). Камерите се поддържат колкото е възможно най-чисти по време на теста, така че концентрацията на органично вещество да е възможно най-ниска, тъй като присъствието на органичен въглерод може да ограничи биологичната годност на тестовото вещество (1).

Понеже много от храненията са получени от рибно месо, то те се анализират за тестовото вещество. Желателно е също да се анализират за пестициди и тежки метали.

▼B

1.8.2.6. Светлина и температура

Фотопериодът обикновено е от 12 до 16 часа, а температурата (± 2°C) трябва да е подходяща за тестовите видове (вж. приложение 2). Типът и характеристиките на осветлението трябва да са познати. Трябва да се внимава относно възможната фототрансформация на тестовото вещество при условията на лъчението на изследването. Използва се подходящо осветление, за да се избегне излагане на рибата на неестествени фотопродукти. В някои случаи може да е подходяща употребата на екран, ограничаващ ултравиолетовите излъчвания под 290 nm.

1.8.2.7. Тестови концентрации

Рибата се излага на проточни условия при поне две концентрации на тестовото вещество във водата. Обикновено по-високата (или най-високата) концентрация се избира да бъде около 1 % от нейната силна асимптотична LC_{50} и поне 10 пъти по-висока от нейния лимит на детекция във вода чрез използвания аналитичен метод.

Най-високата тестова концентрация може също да бъде определена чрез разделяне на силната 96 h LC_{50} при подходящото съотношение силна/продължителна (подходящи съотношения за някои химикали могат да бъдат от 3 до 100). Ако е възможно, изберете друга концентрация(и), така че тя да се различава от горната с коефициент 10. Ако това не е възможно поради критерия 1 % от LC_{50} и аналитичния лимит, може да се използва коефициент или да се разглежда използването на ^{14}C маркирано тестово вещество. Нито една от използваните концентрации не трябва да е над разтворимостта на тестовото вещество.

Когато се използва разтварящ агент, неговата концентрация не трябва да е по-голяма от 0,1 ml/l и трябва да бъде една и съща във всички тестови съдове. Неговият принос, заедно с тестовото вещество, към общото съдържание на органичен въглерод в тестовата вода трябва да е познат. Необходимо е обаче да се положат максимални усилия за избягване употребата на такива материали.

1.8.2.8. Контролни проверки

Една контролна проверка на разреждащата вода или, ако е уместно, на разтварящия агент се извършва допълнително към тестовите серии, при условие че е установено, че агентът няма въздействия върху рибата. Ако не е така, се залагат и двете контролни проверки.

1.8.3. *Честота на измерванията на чистотата на водата*

По време на теста разтвореният кислород, TOC, pH и температурата се измерват във всички съдове. Общата твърдост и соленост, ако е уместно, се измерват при контролните проверки и един съд с по-висока (или най-високата) концентрация. Като минимум разтвореният кислород и солеността, ако е уместно, се измерват 3 пъти — в началото, около средата и в края на периода на поглъщане — и веднъж седмично в периода на очистване. TOC се измерва в началото на теста (24 часа и 48 часа преди началото на теста във фазата на поглъщане). Температурата се измерва ежедневно, pH — в началото и края на всеки период, а твърдостта — веднъж за всеки тест. Желателно е температурата да се контролира непрекъснато поне в един съд.

▼B

1.8.4. *Вземане на проба и анализ на рибата и водата*

1.8.4.1. Програма за вземане на проба на вода и риба

Проба от водата от тестовите камери за определяне на концентрацията на тестовото вещество се взема преди слагането на рибата и по време както на фазата на поглъщане, така и на фазата на очистване. Като минимум проба от водата се взема по същото време, когато се взема от рибата, и преди хранене. По време на фазата на поглъщане се определят концентрациите на тестовото вещество, за да се провери съответствието с критериите за валидност.

Проба от рибата се взема поне при пет случая през фазата на поглъщане и поне при четири през фазата на очистване. Тъй като при някои случаи ще бъде трудно да се пресметне една сравнително точна преценка на стойността на BCF на база броя на пробите, особено когато се използва друга кинетика освен простата кинетика за очистване от първи ред, то може би е препоръчително да се вземат проби по-често и в двата периода (вж. приложение 4). По-голямото количество взети проби се съхранява и анализира само ако резултатите от първия кръг анализи докажат, че не се адекватни за изчислението на BCF с желаната точност.

Пример за приемлива програма за вземане на проби е даден в приложение 4. Могат да се изчислят и други програми, с помощта на други приети стойности на P_{ow}, за да се изчисли времето за излагане при 95 % поглъщане.

Вземането на проби продължава през фазата на поглъщането до установяване на устойчивото състояние или 28 дни, в зависимост от това кое се случва по-напред. Ако устойчивото състояние не се постигне за 28 дни, вземането на проби продължава, докато се постигне или още 60 дни, в зависимост от това кое се случва по-напред. Преди началото на фазата на очистването рибата се прехвърля в чисти резервоари.

1.8.4.2. Вземане на проба и подготовка на пробата

Анализите на водните проби се получават, например, чрез източване през инертни тръби от централната точка в тестовата камера. Понеже нито филтрирането, нито центрофугирането могат винаги да отделят фракцията от тестовото вещество, която не е биологично годна, от тази, която е (особено за суперлипофилни химикали, т.е. онези химикали с log P_{ow} > 5) (1) (5), пробите може да не са обекти на такова третиране.

Вместо това се правят измервания, за да се поддържат резервоарите колкото е възможно най-чисти и общото съдържание на органичен въглерод се контролира и през двете фази — на поглъщане и на очистване.

Подходящ брой риби (нормално минимум четири) се изваждат от тестовите камери при всяко вземане на проби. Тези риби се изплакват бързо с вода, изсушават се и се убиват моментално чрез най-подходящия и хуманен метод, след което се претеглят.

Желателно е рибата и водата да се анализират веднага след вземането на проба с цел да се избегне разлагането или други загуби и да се изчислят приблизителните скорости на поглъщане и очистване, докато тестът продължава. Незабавните анализи избягват закъснението, когато се достига равната част (платото) на кривата.

▼B

Ако не се извършат незабавни анализи, пробите се съхраняват по подходящ метод. Преди началото на изследването се проучва информацията относно подходящи методи за съхранение на конкретното тестово вещество — например дълбоко замразяване, съхранение при 4 °C, продължителност на съхранението, екстракция и др.

1.8.4.3. Качество на аналитичния метод

Понеже цялата процедура се обуславя по същество от точността, прецизността и чувствителността на аналитичния метод, използван за тестовото вещество, проверете експериментално дали прецизността и възпроизводимостта на химичния анализ, а също и възстановяването на тестовото вещество от водата и рибата са задоволителни за конкретния метод. Проверете също тестовото вещество да не е забележимо в използваната разреждаща вода.

Ако е необходимо, стойностите на C_w и C_f, получени при теста, се коригират за стойностите на възстановяване и подготовка от контролните проверки. С пробите вода и риба се борави по начин, който намалява до минимум замърсяването и загубите (които, например, могат да се получат при абсорбция от устройството за вземане на проба).

1.8.4.4. Анализ на пробата риба

Ако при теста се използват радиомаркирани материали, може да се анализира общата радиомаркировка (т.е. източник и метаболити) или пробите може да се почистят така, че основното съединение да се анализира отделно. Също така основните метаболити може да се охарактеризират при устойчиво състояние или в края на фазата на поглъщането, в зависимост от това кое се случва по-напред. Ако BCF по отношение на общите радиомаркирани остатъци е ≥ 1 000 %, може би е желателно, а за някои категории химикали, като пестициди — силно препоръчително, да се идентифицират и определят количествено продуктите на разпадането, представляващи ≥ 10 % от общите остатъци в рибните тъкани при устойчиво състояние. Ако продуктите на разпадането, представляващи ≥ 10 % от общите радиомаркирани остатъци в рибните тъкани, са идентифицирани и определени количествено, тогава се препоръчва да се направи същото и за продуктите на разпадането в тестовата вода.

Концентрация на тестовото вещество обикновено се определя за всяка отделна претеглена риба. Ако това не е възможно, се прави събиране на пробите при всяко вземане на проба, но това ограничава статистическите процедури, които могат да се приложат към данните. Ако една статистическа процедура представлява важен фактор, тогава в теста се включват достатъчен брой риби, за да се пригоди желаната процедура на събиране (6) (7).

BCF се изразява едновременно като функция на общото мокро тегло, а за високолипофилни вещества — като функция на липидното съдържание. Липидното съдържание при рибата се определя при всяко вземане на проба, когато е възможно. За определянето му се използват подходящи методи (препратки 8 и 2 от приложение 3). Екстракционната техника за хлороформ/-метанол може да се препоръча като стандартен метод (9). Различните методи не дават идентични стойности (10), така че е важно да се дадат подробности за използвания метод. Когато е възможно, анализът за липиди се прави върху същия екстракт като този, произведен за анализа за тестовото вещество, понеже липидите често трябва да се отстраняват от екстракта, преди той да бъде анализиран хроматографски. Липидното съдържание на рибата (в mg/kg мокро тегло) в края на експеримента не трябва да се различава от това в началото с повече от ± 25 %. Отчита се също и процентното съдържание на твърди частици в тъканите, за да се позволи превръщане на липидната концентрация от мокра на суха база.

▼B

2. **ДАННИ**

2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Кривата на поглъщането на тестовото вещество се получава чрез изчертаване на нейната концентрация във/върху рибата (или определени тъкани) във фазата на поглъщането спрямо времето в аритметични скали. Ако кривата достигне стабилно равнище, това означава да бъде приблизително асимптотична към времевата ос, устойчивото състояние BCF_{SS} се изчислява от:

$$\frac{C_f \text{като устойчиво състояние (средно)}}{C_w \text{като устойчиво състояние (средно)}}$$

Когато не се достига устойчиво състояние, може би е възможно да се изчисли BCF_{SS} с достатъчна точност за оценка на риска от „устойчиво състояние“ при 80 % ($1{,}6/k_2$) или 95 % ($3{,}0/k_2$) на равновесието.

Определя се също и коефициентът на концентрация (BCF_k) като съотношение k_1/k_2, двете кинетични константи от първи ред. Константата за скорост на очистване (kg) обикновено се определя от кривата на очистването (т.е. графиката на намалението на концентрацията на тестовото вещество в рибата спрямо времето). След това константата за скорост на поглъщане (k_1) се изчислява при дадена k_2 и стойност на C_f, която се получава от кривата на поглъщането (вж. също приложение 5). Предпочитаният метод за получаване на BCF_k и константите за скорост k_1 и k_2 е да се използват нелинейни параметрични изчислителни методи на компютър (11). В противен случай за изчисление на k_1 и k_2 могат да се използват графичните методи. Ако кривата на очистването очевидно не е от първи ред, се прилагат по-сложни модели (вж. позоваванията в приложение 3) и се търси консултация от статистик в областта на биологията.

2.2. ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Резултатите трябва да се тълкуват с внимание, когато измерените концентрации на тестовите разтвори са на нива, близки до лимита на детекция на аналитичния метод.

Ясно определените криви на поглъщане и загуби са показател за биоконцентрационни данни с добро качество. Вариациите в константите поглъщане/очистване между двете тестови концентрации трябва да бъдат по-малки от 20 %. Наблюдаваните значителни разлики в скоростите при поглъщане/очистване между двете приложени тестови концентрации трябва да се отчетат и да получат възможно обяснение. Обикновено границата на достоверност на BCF при добре направени изследвания доближава ± 20 %.

3. **ОТЧИТАНЕ**

Протоколът от теста трябва да включва следната информация:

3.1. ТЕСТОВО ВЕЩЕСТВО

— физическо естество и където е уместно, физикохимични свойства,

— химическа идентификация (включително съдържание на органичен въглерод, ако е уместно),

— ако е радиомаркирано, точно положение на маркирания(те) атом(и) и процент на радиоактивността, свързана с примесите.

▼B

3.2. ТЕСТОВИ ВИДОВЕ

— научно име, род, източник, всякаква предварителна обработка, аклиматизация, възраст, размер и т.н.

3.3. ТЕСТОВИ УСЛОВИЯ

— използвана тестова процедура (например проточна или полустатична),

— тип и характеристики на използваното осветление и фотопериода(ите),

— тестов дизайн (например брой и размер на тестовите камери, скорост на подмяна на обема вода, брой на възпроизвежданията, брой на тестовите концентрации, време на поглъщане и време на очистване, честота на вземане на проби от риба и вода),

— метод на подготовка на наличните разтвори и честота на подновяването им (разтварящият агент, неговата концентрация и приносът му към съдържанието на органичен въглерод в тестовата вода трябва да се посочат, когато се използват),

— номинални тестови концентрации, средни величини на измерваните стойности и техните стандартни отклонения в тестовите съдове и метод, по който са получени,

— източник на разреждаща вода, описание на всякаква предварителна обработка, резултати от всякакви демонстрации на способността на рибата да живее във водата и характеристики на водата: pH, твърдост, температура, концентрация на разтворен кислород, остатъчни нива на хлор (ако се измерват), общо съдържание на органичен въглерод, суспензирали твърди частици, соленост на тестовата среда (ако е уместно) и всякакви други направени измервания,

— качество на водата в тестовите съдове, pH, твърдост, TOC, температура и концентрация на разтворен кислород,

— подробна информация за храненето (например тип на храната, източник, състав — поне липидното и протеиновото съдържание, ако е възможно, количеството, което се дава, и на какви интервали),

— информация за обработката на пробите риба и вода, включително подробности от подготовката, съхранението, екстракцията и аналитичните процедури (и прецизност) за тестовото вещество и липидното съдържание (ако се измерва).

3.4. РЕЗУЛТАТИ

— резултати от всякакви извършени предишни изследвания,

— смъртност на контролната риба и рибата във всяка камера за излагане и всякакво наблюдавано необичайно поведение,

— липидно съдържание на рибата (ако е определено при този тест),

— криви (включително всички измерени данни), показващи поглъщането и очистването на тестовия химикал в рибата, времето на устойчиво състояние,

▼B

— C_f и C_w (със стандартно отклонение и гама, ако е уместно) за всички времена на вземане на проба (C_f изразено в μg/g мокро тегло (ppm) от цялото тяло или определени негови тъкани, например липиди, и C_w в μg/ml (ppm). Стойностите не C_w за контролните серии (произходът също се отчита),

— биоконцентрационен коефициент в устойчиво състояние (BCF_{SS}) и/или кинетичен коефициент на концентрация (BCF_k) и, ако е приложимо, 95 % граници на достоверност за константите на скорост на поглъщане и очистване (загуба) (всички изразени по отношение на цялото тяло и общото липидно съдържание, ако се измерва, на животното или определени негови тъкани), граници на достоверност и стандартно отклонение (ако има) и методи на анализ на изчисления/данни за концентрация на използваното тестово вещество,

— когато се използват радиомаркирани вещества и ако се изисква, може да се даде натрупването на всички открити метаболити,

— всичко необичайно относно теста, всяко отклонение от тестовите процедури и всякаква друга уместна информация.

Намалете до минимум резултати като „неоткрито за времето на детекция“, като разработите предварителен тестов метод и експериментален дизайн, защото такива резултати не могат да се използват за изчисления на константите за скорост.

4. **ПРЕПРАТКИ**

(1) Connell D. W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, pp. 117—156.

(2) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Non-linear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, pp. 29—390.

(3) OECD, Paris (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No 3.

(4) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(5) US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Document for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. uly 1994.

(6) US FDA (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.

(7) US EPA (1974). Section 5, A(1). Analysis of Human or animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Evironmental Samples, Thompson J. F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

(8) Compaan H. (1980) in 'The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation©, Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, the Hague, Netherlands.

▼B

(9) Gardner et al, (1995). Limn. & Oceanogr. 30, pp. 1099—1105.

(10) Randall R. C, Lee H., Ozretich R. J., Lake J. L. and Pruell R. J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Toxicol. Chem. 10, pp 1431—1436.

(11) CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method- Ring Test Programme, 1984 to 1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.

(12) ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988). Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

▼B

Приложение 1

Химически характеристики на приемлива разреждаща вода

	Вещество	Гранична концентрация
1	Специфично вещество	5 mg/l
2	Общо органичен въглерод	2 mg/l
3	Нейонизиран амоняк	1 µg/l
4	Остатъчен хлор	10 µg/l
5	Общо органофосфорни пестициди	50 ng/l
6	Общо органохлорни пестициди плюс полихлорирани бифенили	50 ng/l
7	Общо органичен хлор	25 ng/l
8	Алуминий	1 µg/l
9	Арсен	1 µg/l
10	Хром	1 µg/l
11	Кобалт	1 µg/l
12	Мед	1 µg/l
13	Желязо	1 µg/l
14	Олово	1 µg/l
15	Никел	1 µg/l
16	Цинк	1 µg/l
17	Кадмий	100 ng/l
18	Живак	100 ng/l
19	Сребро	100 ng/l

▼B

Приложение 2

Видове риба, препоръчвани за тест

	Препоръчвани видове	Препоръчвана гама за тестова температура (°C)	Препоръчвана обща дължина на тестовото животно (cm)
1	Danio rerio ([1]) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) — аквариумна рибка Данио	20—25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) — вид лещанка	20—25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) — шаран	20—25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) — японска оризова рибка	20—25	4,0 ± 1,0
5	Poccilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) — гупа	20—25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) — вид слънчева рибка	20—25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) — дъгова пъстърва (американска пъстърва)	13—17	8,0 ± 4,0
8	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) — триглава бодливка	18—20	3,0 ± 1,0

([1]) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231.

В различните страни се използват различни речни и морски видове, например:

Leiostomus xanthurus

Cyprinodon variegatus

Menidia beryllina

Cymatogaster aggregata

Parophrys vertulus

Leptocottus armatus

Gasterosteus aculeatus Триглава бодливка

Dicentracus labrax Лаврак

Alburnus alburnus Уклей

Събиране

Пресноводната риба, дадена в таблицата, е лесна за развъждане и/или се среща през цялата година, като се има предвид, че наличността на морските и речните риби е частично ограничена 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 срещат в много части на света.

▼B

Приложение 3

Предвиждане на продължителността на фазите на поглъщане и очистване

1. *Предвиждане на продължителността на фазата на поглъщане*

Преди извършването на теста се прави пресмятане на k_2 и следователно някакъв процент време, необходим за достигане на устойчиво състояние, може да се получи от емпиричната връзка между k_2 и коефициент на разделяне октанол/вода (P_{ow}) или kg и водоразтворимостта (s).

Пресмятане на k_2 (ден$^{-1}$) се получава например от следната емпирична връзка (1):

$\log_{10}k_2 = - 0{,}414 \log_{10}(P_{ow}) + 1{,}47$ ($r^2 = 0{,}95$) (уравнение 1)

За другите връзки вижте препратка 2.

Ако коефициентът на разделяне (P_{ow}) не е известен, пресмятане може да се направи (3) от информацията за водоразтворимост (s) на веществото, като се използва:

$\log_{10}(P_{ow}) = 0{,}862 \log_{10}(s) + 0{,}710$ ($r^2 = 0{,}994$) (уравнение 2)

където

s = разтворимост (mol/l): (n = 36).

Тези връзки се прилагат само за химикали със стойности на log P_{ow} между 2 и 6,5 (4).

Времето, необходимо за достигане на процент устойчиво състояние, може да се получи чрез прилагане на пресмятането за k_2 от общото кинетично уравнение, описващо поглъщане и очистване (кинетика от първи ред):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

Или ако C_w е константа:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \, (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{(уравнение 3)}$$

Когато се достигне устойчиво състояние ($t \rightarrow \infty$), уравнение 3 може да се редуцира (5) (6) до:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \text{ or } C_f/C_w = k_1/k_2 = \text{BCF}$$

Тогава k_1/k_2 . C_w е едно приближение към концентрацията в рибата при устойчиво състояние ($C_{f,\ s}$).

Уравнение 3 може да се напише така:

$$C_f = C_{f,s}(1 - e^{-k_2 t}) \text{ or } \frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{(уравнение 4)}$$

Като приложим уравнение 4, времето за достигане на някакъв процент устойчиво състояние може да се предвиди, когато k_2 е преизчислено с помощта на уравнение 1 или 2.

▼B

Като насока, статистически оптималната продължителност на фазата на поглъщане за производство на статистически приемливи данни (BCF_k) е онзи период, който се изисква за логаритмичната крива на концентрация на тестовото вещество в рибата спрямо линейното време за достигане на средната му точка, или $1,6/k_2$, или 80 % от устойчивото състояние, но не повече от $3,0/k_2$ или 95 % устойчивото състояние (7).

Времето за достигане на 80 % от устойчивото състояние е (уравнение 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ or } t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad \text{(уравнение 5)}$$

По подобен начин 95 % от устойчивото състояние е:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \quad \text{(уравнение 6)}$$

Например продължителността на фазата на поглъщане (up) за тестово вещество с log P_{ow} = 4 ще бъде (използвайки уравнения 1, 5 и 6):

$\log_{10}k_2 = - 0,414.(4) + 1,47$ $\quad k_2 = 0,652$ дни$^{-1}$

up (80 %) = 1,6/0,652, т.е. 2,45 дни (59 часа)

или up (95 %) = 3,0/0,652, т.е. 4,60 дни (110 часа)

По подобен начин за тестово вещество с s = 10^{-5} mol/1 (log(s) = 5,0), продължителността на up ще бъде (използвайки уравнения 1, 2, 5 и 6):

$\log_{10}$ (P_{ow}) = 0,862 (– 5,0) + 0,710 = 5,02

$\log_{10}k_2$ = 0,414 (5,02)+1,47

k_2 = 0,246 дни$^{-1}$

up (80 %) = 1,6/0,246, т.е. 6,5 дни (156 часа)

или up (95 %) = 3,0/0,246, т.е. 12,2 дни (293 часа)

Алтернативно изразът:

t_{eq} = 6,54 × 10^3 P_{ow} + 55,31 (часа)

може да се използва за изчисляване на времето за достигане на ефективно устойчиво състояние (4).

2. *Предвиждане на продължителността на фазата на очистване*

Предвиждане на времето, необходимо за намаляване на товара на теглото до някакъв процент на начална концентрация, може също да се получи от общото уравнение, описващо поглъщането и очистването (кинетика от първи ред) (1) (8).

За фазата на очистването C_w се приема за нула. Уравнението може да се редуцира до:

$$\frac{dC_f}{dt} = - k_2 C_f \text{ or } C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

▼B

където $C_{f,\,o}$ е концентрацията при старта на периода на очистването. Тогава 50 % очистване ще се достигне за времето (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \text{ or } t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

По подобен начин 95 % очистване ще се достигне при:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Ако 80 % поглъщане се използва за първия период ($1,6/k_2$) и 95 % загуба при фазата на очистването ($3,0/k_2$), тогава фазата на очистването е приблизително два пъти продължителността на фазата на поглъщането.

Важно е да се отбележи обаче, че пресмятанията са базирани на допускането, че кривите на поглъщане и очистване ще следват кинетика от първи ред. Ако такава кинетика не се получи, трябва да се използват по-сложни модели (например препратка 1).

ПРЕПРАТКИ (в приложение 3)

(1) Spacie A. and Hamelink J. L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. and Chem. 1, pp. 309—320.

(2) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of BCFs derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.

(3) Chiou C. T. and Schmedding D. W. (1982). Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. Environ. Sci. Technol. 16 (1), pp. 4—10.

(4) Hawker D. W. and Connell D. W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), pp. 701—707.

(5) Branson D. R., Blau G. E., Alexander H. C. and Neely W. B. (1975). Transactions of the American Fisheries Society, 104 (4), pp. 785—792.

(6) Ernst W. (1985). Accumulation in Aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P. H. Part 4.4, pp. 243—255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd N.Y.

(7) Reilly P. M., Bajramovic R., Blau G. E., Branson D. R. and Sauerhoff M. W. (1977). Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kenetic models, Can. J. Chem. Eng. 55, pp. 614—622.

(8) Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980). Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, pp. 3—19.

▼B

Приложение 4

Теоретичен пример за програма за вземане на проби за биоконцентрационни тестове на вещества с log P_{ow} = 4

Вземане на проба от риба	Програма за вземане на проби		Брой на пробите вода	Брой на рибите за проба
	минимална изисквана честота (дни)	допълнително вземане на проби		
Фаза на поглъщане	-1 0		2 (*) 2	Прибавете 45 до 80 риби
1-ва	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2-ра	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3-та	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4-та	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5-та	4,7		2	6
Фаза на очистване				Прехвърлете рибата към вода без тестови химикали
6-та	5,0	5,3		4 (4)
7-ма	5,9	7,0		4 (4)
8-ма	9,3	11,2		4 (4)
9-та	14,0	17,5		6 (4)

(*) Пробата вода след минимум три прехвърляния на обема на камерата.

Стойностите в скобите са броят на пробите (вода, риба), които трябва да се вземат, ако се прави допълнително вземане на проби.

Забележка: Предварително пресмятане на k_2 за log P_{ow} от 4,0 е 0,652 дни$^{-1}$. Общата продължителност на експеримента е за 3 × up = 3 × 4,6 дни, т.е. 14 дни. За пресмятането на „up“ се обърнете към приложение 3.

▼B

Приложение 5

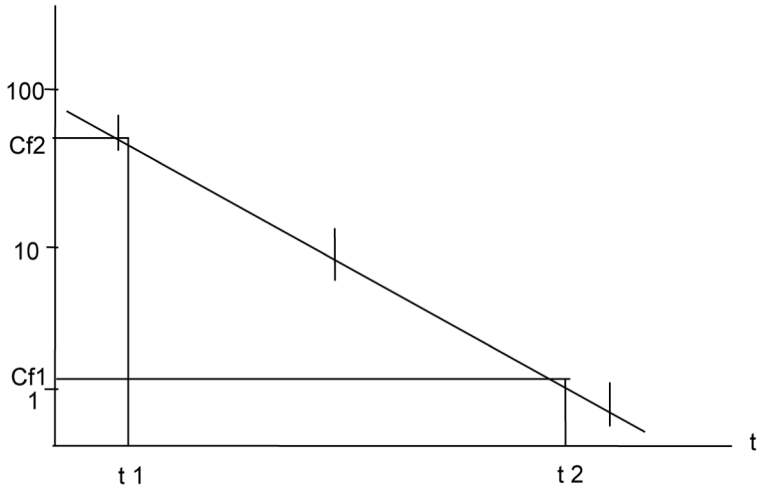
Оценка на модела

Повечето данни за биоконцентрация се считат за сравнително добре описани чрез прост модел на две прегради/два параметъра, както е показано чрез правата линия на графиката, която се доближава до точките на концентрация в рибата, по време на фазата на очистване, когато са изчертани върху полулогаритмична хартия. (Когато тези точки не могат да се опишат с такава права линия, тогава трябва да се използват по-сложни модели, например този на Spacie and Hamelink, препратка 1 в приложение 3).

Графичен метод за определяне на константата на очистване (загуба) k_2

Изчертайте концентрацията на тестовото вещество, отчетена във всяка проба от риба спрямо времето за вземане на проба, върху полулогаритмична хартия. Наклонът на тази линия е k_2.

$$k_2 = \frac{\ln (C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Забележете, че отклоненията от правата линия може да означават по-сложна графика на очистването от такава в кинетика първи ред. Може да се приложи графичен метод за анализиране на видове очистване, което се отклонява от кинетика първи ред.

Графичен метод за определяне на константата на поглъщане k_1

При дадена k_2 изчислете k_1 както следва:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{(уравнение 1)}$$

Стойността на C_f се отчита от средната точка на гладката крива на поглъщането, получена от данните, когато log концентрация се изчертава спрямо времето (върху аритметична скала).

▼B

Компютърен модел за изчисление на константите на скоростта на поглъщане и очистване

Предпочитан начин за получаване на коефициента на биоконцентрация и на константите за скорост k_1 и k_2 е използването на нелинейни параметрични изчислителни методи на компютър. Такъв софтуер намира стойностите на k_1 и k_2 при наличие на данни за време и концентрация и модела:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{(уравнение 2)}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}\right) \quad t < t_c \qquad \text{(уравнение 3)}$$

където t_c = време в края на фазата на поглъщане.

Този подход осигурява изчисление на k_1 и k_2 със стандартно отклонение.

Понеже k_2 в повечето случаи може да се пресметне от кривата на очистването с относително висока точност и тъй като съществува силна корелация между двата параметъра k_1 и kg, ако се пресмятат едновременно, препоръчително е първо да се изчисли k_2 само от кривата на очистването, а след това да се изчисли k_1 от данните за поглъщане, като се използва нелинейна регресия.

▼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 въздействията 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 B.

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 тествaната концентрация непосредствено под концентрацията LOEC.

EC_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 phytogenetic 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 ненаблюдаваното въздействие (NOEC).

1.4. ИНФОРМАЦИЯ ЗА ТЕСТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

Резултатите от теста за остра токсичност (виж метода на тест B.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 B.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 ± 1°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 ± 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 pH на водата е от 6,5 до 8,5, но по време на тестване е ± 0,5 pH единици. Препоръчва се твърдост над 140 mg/l (като $CaCO_3$). 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 SO_4), 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 водата 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 триетиленгликолът. Примери за подходящи диспергиращи устройства са Cremophor 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 потоковите 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 разредител, 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 дъговата пъстърва честотата на отстраняване на водата по време 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**

Дъговата пъстърва *(Oncorhynchus mykiss)* е видът, които 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 които 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 третират 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 регресен модел ($r_2 < 0,9$), 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 ± 10 % от средното аритметическо тегло и при всички случаи не надвишава 25 %. Препоръчва се да се измерва и теглото на подобразец 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 ± 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, pH 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. PH се измерва в началото и след всяка смяна на водата при статичните възстановими тестове и поне веднъж в седмицата при потоковите 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 студеното 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_i = 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_i, W_2 = са теглото на отделната риба при време съответно t_1 и t_2

$\log_e w_i$ = 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_i 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_i и t_2 = е времето (дните) в началото и в края на периода на изследване

r_i, 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_X т.е. всички необходими стойности на ЕС. Използването на този метод на изчисляване на r за отделната риба (r_i) 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 г за всяка концентрация със средното г 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: pH, 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: pH, 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 Seriese 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 Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(21) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp. 510—531.

▼B

Приложение 1

ВИДОВЕ РИБИ, ПРЕПОРЪЧАНИ ЗА ТЕСТВАНЕ И ПОДХОДЯЩИ УСЛОВИЯ ЗА ИЗВЪРШВАНЕ НА ТЕСТА

Видове	Препоръчител на 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:								
Oncorhynchus mykiss 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 сьомги	≥ 28
Други добре документирани видове:species:								
Danio rerio риба зебра	21—25	12—16	0,050—0,100	Най-близо до 1 mg	0,2—1,0	5—10	Сурова храна (*Brachionus Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes оризова риба (Медака)	21—25	12—16	0,050—0,100	Най-близо до 1 mg	0,2—1,0	5—0	Сурова храна (*Brachionus Artemia*)	≥ 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 поли-хлоринатен бифенил	< 50ng/l
Общ органичен хлор	< 25 ng/l

▼B

Приложение 3

логаритмични серии на концентрации, подходящи за извършвоне 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 концентрациите 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 ОИСР 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 покрият 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 (telepstei, 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 (таблици IA и IБ).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Най-ниска концентрация на въздействие (LOEC): 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 LOEC трябва да имат вредно въздействие равно на или по-голямо от това, наблюдавано при LOEC.

Концентрация на ненаблюдавано въздействие (NOEC): това е тестваната концентрация непосредствено под LOEC.

▼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 потоковата процедурата. Изборът зависи от вида на тестваното вещество. Тестът започва чрез поставяне на оплодената яйце в тестовите 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 ТЕСТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

Следва да са на разположение и резултатите от теста за акутната токсичност (виж метод B.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, pKa, P_{ow} и резултатите от теста за готовност за биоразграждане (вж. метод B.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 ± 1,5ºC между тестовите 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 подреждане на случаен принцип на стендовете за изпитване, като във всеки стенд са представени всички извършващи се обработки, преди напълно хаотичното подреждане. Ако се използва блокиране, то се взима 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 ОИСР 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 тествания 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 сьомгата 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]) ОИСР, 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. PH следва да остане в границите от ± 0,5 pH 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 SO_4), пестициди (например органофосфор, и общо съдържание на органохлорни 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 жизнеспособните яйца и ларви внимателно се пренасят в нови съдове с малко количество от стария разтвор, избягвайки излагането на въздух, или И) 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 стойностите 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.

▼B

За потоковите тестове се изисква система, която постоянно дозира и разрежда основния разтвор на тестваното вещество (например измерваща помпа, пропорционален разредител, 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/1 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/1 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 ± 20 %, (т.е. в стойности 80—120 %; виж 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 ± 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 ± 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 тестовете, 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 небиологичните частици от биологичните, пробите може да не подлагат на тези третирания.

По време на теста следва да бъдат измервани разтвореният кислород, pH 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 pH става в началото и след всяка смяна на водата при полустатичните тестове и поне веднъж в седмицата при потоковите 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. гаструла) 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 стадиите 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.

▼B

1.7.5.3. *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 анормалните ембриони и ларви се появяват по нормален начин и могат да бъдат от порядъка на няколко процента от контролните серии при някои видове. Анормалните животни следва да се отстраняват от съда за тестване само при смърт.

1.7.5.4. *Анормално държание*

Анормалните 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 ≤ 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 ≤ 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 анормален вид;

— брой на ларвите, проявили анормално 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: pH, 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: pH, 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 стадиите 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 отклонение, ако има такива;

— разпространение и описание на въздействието върху държанието, 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 comperative 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 1A

Видове риби, които се препоръчват за използване при тестове

СЛАДКОВОДНИ
Oncorhynchus mykiss
дъгова пъстърва (9) (16)
Danio rerio
риба зебра(7) (17) (18)
Cyprinus caprio
шаран (8) (19)
Oryzias latipes
японска оризова риба (медака)(20) (21)
Pimephales promelas
рибка бодливка (8) (22)

▼B

Таблица 1Б

Примери за други добре документирани видове, които също могат да се използват

СЛАДКОВОДНИ	СОЛЕНОВОДНИ
Carassius auratus Златна рибка (8)	*Menidia peninsualae* Крайбрежна дребна риба (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus Риба луна (8)	*Clupea harengus* Херинга (24) (25)
	Gadus morhua Риба треска (24) (25)
	Cyprinodon variegatus Рибка бодливка (23) (24) (25)

▼B

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, pH 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 оплождат. 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 солнични 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, предшестващ 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 който 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 репродуктивностq 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 25º C 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 pH и за твърдост на водата, съдържаща разтвора, са 7, 8 и съответно 250 mg $CaCO_3$/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 измервания 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.

▼B

LC_{50} И EC_{50} 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, LC_{50} се определя чрез подходящ метод в края на теста.

Ако е желателно включването на морфологичните аномалии в статистическите данни за EC_{50}, 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 Zebrabärbling *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173—181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1—333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69—81.

(6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096—1121.

(7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 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.

Приложение 2

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								
Brachydanio rerio риба зебра *DANIORERIO*	25±1	—	12–16	3–5	8–10	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гаструла) до 5 дни след изхвърлянето на хайвера (8—10 дни)	80	90
ONCORHYNCHUS MYKISS дъгова пъстърва	10±1 ([1]) 12±1 ([2])	—	0 ([a])	30–35	25–30	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гаструла) до 20 дни след изхвърлянето на хайвера (50—55 дни)	66	70
CYPRINUS CAPRIO шаран	21–25	—	12–16	5	>4	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гаструла) до 4 дни след изхвърлянето на хайвера (8—9 дни)	80	75
ORYZIAS LATIPES 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 гаструла) до 5 дни след изхвърлянето на хайвера (13—16 дни)	80	80
PIMEPHALES ROMELAS рибка бодливка	25±2	—	16	4–5	5	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гаструла) до 4 дни след изхвърлянето на хайвера (8—9 дни)	60	70

([1]) За ембриони.
([2]) За ларви.
([a]) 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.

▼B

Приложение 3

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								
Carassius auratus златна рибка	24 ± 1	—	—	3—4	>4	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гаструла) до 4 дни след изхвърлянето на хайвера (7 дни)	—	80
Lepomis macrochirus риба луна	21 ± 1	—	16	3	>4	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гаструла) до 4 дни след изхвърлянето на хайвера (7 дни)	—	75
СОЛЕНОВОДНИ								
Menidia peninsualae крайбрежна дребна риба		15—22	12	1,5	10	Колкото е възможно по скоро след оплождането (ранен стадий гаструла) до 5 дни след изхвърлянето на хайвера (6—7 дни)	80	60
Clupea harengus херинга	10±1	8—15		20—25	3—5	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гаструла) до 3 дни след изхвърлянето на хайвера (23—27 дни)	60	80
Gadus morhua риба треска	5 ± 1	5—30	12	14—16	3—5	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гаструла) до 3 дни след изхвърлянето на хайвера (18 дни)	60	80
Cyprinodon variegates рибка бодливка	25 ± 1	15—30	12	—	—	Колкото е възможно по-скоро след оплождането (ранен стадий на гаструла) до 4/7 дни след изхвърлянето на хайвера (28 дни)	>75	80

▼B

Допълнение 4

НЯКОИ ХИМИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ДОПУСТИМ РАЗТВОР ВвВ 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 ОИСР 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 (μg/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).

LD_{50} (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 LD_{50} 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 LD_{50} 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;

— LD_{50} 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, 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 пилило. Събирането в ранна пролет или късна есен се избягва, тъй като пчелите изменят физиологията си през това време. Ако тестовете 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 ± 2ºC. 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 статистическия 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 анормално 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 анормално 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 LD_{50} 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. LD_{50} 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 LD_{50} с 95 % граници на сигурност за всяко време, препоръчано за наблюдение, за тестваното вещество и токсичния стандарт;

— статистически процедури, използвани за определяне на LD_{50};

— смъртност при контролите;

— други биологически ефекти, наблюдавани или измерени т.е. анормално поведение на пчелите (включително изхвърляне на тестваната доза), количеството консумирана храна при третираните 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 ОИСР 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 полуполеви 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).

LD_{50} (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. LD_{50} 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 смътност остава на приемливо ниво, т.е. ≤ 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 LD_{50} 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;

— LD_{50} 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 тестовете 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 меденатa 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 упояват с въглероден диоксид или амоняк за да се приложи тестваното вещество. Количеството използвано упойващо 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 разтваряне 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 статистическия метод, който е избран за анализиране на резултатите. Тестовете 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 анормално 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 LD_{50} 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 анормално 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 (LD_{50}) с 95 % граници на сигурност. Коригирането на контролната смъртност може да се направи като се използва поправката на Абот (4) (5). LD_{50} 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 LD_{50} с 95 % граници на сигурност за всяко време, препоръчано за наблюдение, за тестваното вещество и стандарта на токсичност;

— статистически процедури, използвани за определяне на LC_{50};

— смъртност при контролите;

— други биологически ефекти, наблюдавани или измерени, и анормално 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 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.18. АДСОРБЦИЯ/ДЕСОРБЦИЯ ЧРЕЗ ИЗПОЛЗВАНЕ МЕТОДА ЗА РАВНОВЕСИЕ В ГРУПАТА

1. МЕТОД

Този метод е точно копие на ОИСР 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 значение 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 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 pH). 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 pH 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 (ECEC), 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 pH. 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 $\Delta\ t_i$	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	μg cm^{-3}
C_0	Първоначална концентрация на масата на тествания разтвор при контакт с почвата	μg cm^{-3}
$C_{ap}^{ads}(t_i)$	Концентрация на масата веществото във водната фаза при адсорбционно равновесие	μg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	Първоначално количество на водната фаза при контакта с почвата по време на теста за адсорбция	μg g^{-1}
$C_{ap}^{ads}(eq)$	Концентрация на масата на веществото във водната фаза при време ti и извършен анализ	μg 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	cm^3 g^{-1}
K_{co}	Коефициент на нормализирана адсорбция на органичен въглерод	cm^3 g^{-1}
K_{so}	Коефициент на нормализирано разпространение на органични частици	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	Коефициент на адсорбция на Фройндлих	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ 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 Δ t_i	%
K_{des}	Коефициент на явна десорбция	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	Коефициент на десорбция на Фройндлих	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ 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 Δ t_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 Δ t_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	μg g^{-1}

▼B

Символи	Определения	Единици
$C_{ap}^{des}(ec)$	Концентрация на масата тестваното вещество във водната фаза при десорбно равновесие	μg 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 $CaCl_2$, се прибавят известни количества разтвор от тестваното вещество, не-етикетирани или радиоетикетирани при известна концентрация от 0,01 M $CaCl_2$. 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 ТЕСТВАНОТО 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 (A.6);

б) парно налягане (A.4) и/или константа на закона на Хенри;

в) абиотично разлагане: хидролиза като функция на pH (B.7);

г) коефициент на разделянето (A.8);

д) готова биоразложимост (B.4) или аеробни и анаеробни трансформации в почвата;

е) pKa 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 ($S_w < 10^{-4}$ 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 тефлонова 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 pH. 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 pH на почвата да бъде измерено в разтвор от 0,01 M $CaCl_2$ (това е разтворът, използван при тестване на адсорбцията/десорбция) 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 тарирането 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/дисорбцията. 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 pH 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.

▼B

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 A до максимум 20 cm дълбочина. Особено за вид почва n. 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, pH и CEC (капацитета 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 ≤ 2mm; 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 ($S_w < 10^{-4}$ 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 дейонинизирана 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 $CaCl_2$, т.е. 100 cm^3 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 покъсно 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 + $CaCl_2$ разтвор (без тестваното вещество).

Аналитичните методи, които могат да се използват за измерване на разтворимостта, включва газово-течна хроматография (GLC), високоефективна течна хроматография (HPLC), спектрометрия (т.е. GC/тегло спектрометрия, HPLC/тегло спектрометрия) и броене на течна сцинтилация (за радиоетикетирани 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.

▼B

1.8.2. **Избор на оптимално отношение почва/разтвор**

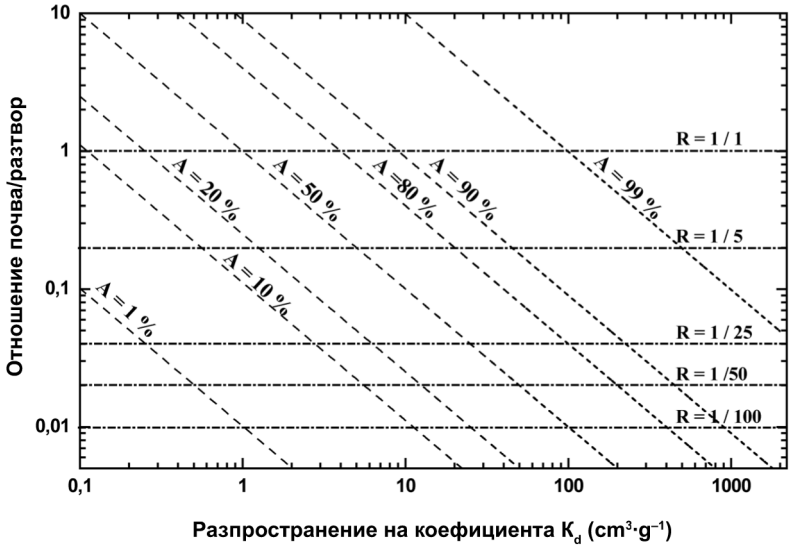
Изборът на подходящо съотношение почва към разтвор за извършване на проучване на разтворимостта, зависи от коефициента на разпространение K_d и съответната степен желана адсорбция. Изменението на концентрацията на веществото в разтвора определя статистическата точност на измерването, което се основава 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):

$$\frac{V_0}{m_{pûda}} = \left(\frac{m_0}{m_p^{ads}(eq)} - 1 \right) K_d \qquad (1)$$

или в неговата логаритмична форма, изчисляваща,
че $R = m_{пръст}/V_0$ и $\frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)} \right] \qquad (2)$$



Фигура 1 Отношения между съотношението почва/разтвор и K_d при различните проценти на адсорбирано тествано вещество

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼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 де 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 уравновесяване. 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 другия 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 cm^3 воден разтвор на тестваното вещество (съотношение 1:5);

— 2 g почва и 50 cm^3 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 $CaCl_2$ разтвор и неговата възможна адсорбция върху повърхността на съдовете за тестване, една контролна проба само с тестваното вещество при разтвор 0,01 M $CaCl_2$ (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 cm^3 на 0,01 M $CaCl_2$ (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 cm^3 на 0,01 M $CaCl_2$ 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 cm^3. Това добавено количество основен разтвор: а) не надвишава 10 % от крайното количество от 50 cm^3 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 (C_0) 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 (C_0) 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_{st}). 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 cm^3 на 0,01 M $CaCl^2$ равновесен разтвор (= 10 % от основния разтвор на 50 cm^3 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_i} 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_i} 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_i} 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 $\left(C_{aq}^{ads}\right)$ 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 получат 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 (коефициент 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 таблица1. 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 $CaCl_2$ 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 $CaCl_2$ разтвор (без почва), служеща за това да предпази от неочакваното.

Процентът адсорбция се изчислява при определено време A_{t_i} и/или интервал от време $A_{\Delta t_i}$ (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 $K_d \leq 1$ cm^3 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 извличането, 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 cm^3 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_dс 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 важността на модела на адсорбция се намира в раздел „Препратки“ (41) (45) (80) (82).

Забележка: Трябва да се отбележи, че сравняването на K_F (коефициента на адсорбция на Фройндлих) стойността за различните вещества е възможна 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 нереверсивно адсорбиран върху почвата. Тази информация е важна, тъй като процеса на десорбциа 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 M $CaCl_2$ разтвор без тестваното вещество и тегло и съответно обем, идентични на тези от експеримента. Като контролна проба тестваното вещество в разтвор 0,01 M $CaCl_2$ 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 M $CaCl_2$ 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 M $CaCl_2$ без тестваното вещество. Новата смес се разбърква отново докато се получи равновесие на десорбцият. 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 M $CaCl_2$ 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_i})) и/или за интервал от време ($(D_{\Delta t_i})$) (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_i} и адсорбция A_{t_i} 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 cm^3 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:

$$A_{t_i} = \frac{m_p^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (3)$$

където:

A_{t_i} = процентът на адсорбция при определено време t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = масата тествано вещество, адсорбирано върху почвата при време ti (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.

$$K_d = \frac{C_p^{ads}(eq)}{C_{vod}^{ads}(eq)} = \frac{m_p^{ads}(eq)}{m_{vod}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{půda}} \ (cm^3 \cdot g^{-1}) \qquad (4)$$

където:

$C_s^{ads}(eq)$ = съдържание на адсробираното вещество върху почвата при равновесие на адсорбция (μg g^{-1});

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = 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;

$m_s^{ads}(eq)$ = маса на веществото адсорбирано върху почвата при равновесие на адсорбция (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = 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 (cm^3).

Отношението между A_{eq} и K_d е дадено чрез:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{půda}} (cm^3 \cdot g^{-1}) \qquad (5)$$

▼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:

$$K_{ou} = K_d \cdot \frac{100}{\%ou} (cm^3 \cdot g^{-1}) \quad (6)$$

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:

$$C_p^{ads}(eq) = \frac{m_p^{ads}(eq)}{m_{půda}} = \frac{\left[C_0 - C_{vod}^{ads}(eq)\right] \cdot V_0}{m_{půda}} (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (7)$$

Уравненията на Фройндлих изотермите на адсорбция са показани в:

$$C_p^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{vod}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (8)$$

или в линейна форма:

$$\log C_p^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{vod}^{ads}(eq) \quad (9)$$

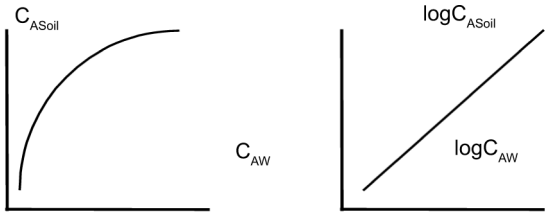
където:

K_F^{ads} = коефициент на адсорбция на Фройнндлих; неговата геометрична характеристика е cm^3 g^{-1}, само ако 1/n = 1; във всички други случаи наклонената 1/n се въвежда в геометричната характеристика на K_F^{ads} ($\mu g^{1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n} \cdot g^{-1}$);

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.

▼B



2.1.2. **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:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{vod}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \ (\%) \qquad (10)$$

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 (μg 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 тестван вещество, което е десорбирано, отнасящо се към количеството вещество предварително адсорбирано при условията на извършване на теста:

$$D_{t_i} = \frac{m_{vod}^{des}(t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

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 процентсj десорбция D_{t_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:

$$K_{des} = \frac{m_p^{ads}(eq) - m_{vod}^{des}(eq)}{m_{vod}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{půda}} (cm^3 \cdot g^{-1}) \quad (12)$$

където:

K_{des} = коефициент на десорбция ($cm^3\ g^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = маса на десорбирано от почвата при равновесие на десорбция (μg);

V_T = общ обем на водната фаза в контакт с почната 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 предшествало, 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:

$$C_p^{des}(eq) = \frac{m_p^{ads}(eq) - m_{vod}^{des}(eq)}{m_{půda}} (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ се определя като

$$m_{vod}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{vod}^{A}(\mu g) \quad (14)$$

където:

$C_s^{ads}(eq)$ = съдържание на адсорбираното вещество върху почвата при равновесие на десорбция (μg 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);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = масата вещество в разтвора при равновесие на адсорбция (μg);

$$m_{vod}^{A} = m_{vod}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^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:

$$C_p^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{vod}^{des}(eq)^{1/n} \ (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (16)$$

или в линейна форма

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

където:

$C_{aq}^{des}(eq)$ = коефициент на десорбция на Фройндлих;

n = константа на регресията;

$C_{aq}^{des}(eq)$ = концентрация на масата на веществото във водна фаза при равновесие на десорбция (μg g^{-3}).

Уравнения 16 и 17 са изобразени графично и стойностите K_F^{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_F^{ads} и K_F^{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 pH (в 0,01 M $CaCl_2$);

— 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 Karickoff S. W., (1990), „Sorption estimates for modeling“, in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80—101,

(36) Lambert S. M., (1967), „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure“. J. Agri. Food Chem., 15, 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/-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.

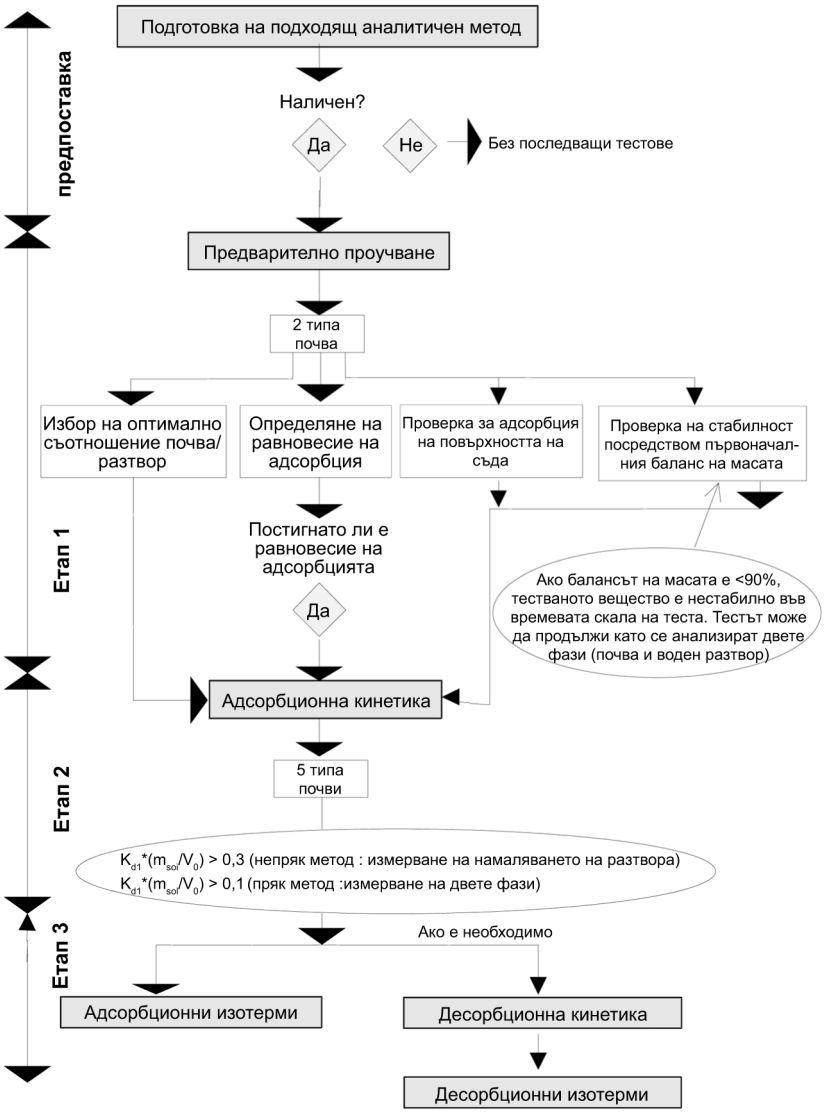
(84) Guth, J. A., (1985), „Adsorption/desorption“, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1—3, Canterbury, UK.

(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 тестване



▼B

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 μg) и маса на равновесието ($m_s^{ads}(eq)$ = 100 μg) 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)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (μg cm-^{3})	R	$m_s^{ads}(eq)$∗ (μg)	$C_s^{ads}(eq)$∗ (μg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
	ЗА *A* = 9 %							
τ_0 = 100 μg или C_0 = 1.100 μg.cm^{-3}	100	1,000	Действителна стойност	10	1,00	Действителна 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 %
	ЗА *A* = 55 %							
τ_0 = 100 μg или C_0 = 1.100 μg.cm^{-3}	50,0	0,500	Действителна стойност	60,0	6,00	Действителна 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 %
	ЗА *A* = 99 %							
τ_0 = 100 μg или C_0 = 1.100 μg.cm^{-3}	1,100	0,011	Действителна стойност	108,9	10,89	Действителна 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 μg g^{-1}

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = съдържанието на тестваното вещество във водната фаза при равновесие μg cm-^{3}

R = аналитична грешка при определяне на $m_{aq}^{ads}(eq)$

R_+^+ = грешка, получена заради аналитичната грешка R.

▼B

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:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1})$$

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 не-полярни. 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 a Mingelgrin (1984) (66)
Алифатни, ароматично хлорирани вещества	$\log K_{om} = (4,040 +/- 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$	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	$\log K_{oc} = - 1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Различни съединения	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade(1982) (73)

▼B

Приложение 4

ИЗЧИСЛЕНИЯ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА УСЛОВИЯТА, ПРИ КОИТО СЕ ИЗВЪРШВА ЦЕНТРОФУГА

1. Времето за центрофуга е дадено чрез следната формула, вземайки за дадено

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln (R_b/R_t) \qquad (1)$$

За рационалните цели всички параметри са описани в не-SI единици (g, cm).

Където:

ώ = скоростта на ротация (= 2 π rpm/60), rad s^{-1};

rpm = обороти на минута;

η = вискозитет на разтвора, g s^{-1} cm^{-1};

r_p = радиус на частицата, cm;

p_s = плътност на почвата, g cm^{-3};

p_{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 η = 8,95 × 10^{-3} g^{-1} cm^{-1} и ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3}.

След това времето за центрофуга е дадено в уравнение (2):

$$t = \frac{3,7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2(\rho_p - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \qquad (2)$$

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 (rpm), за да се постигне разделяне на частиците с определен размер (в нашия случай 0,1 μm 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.

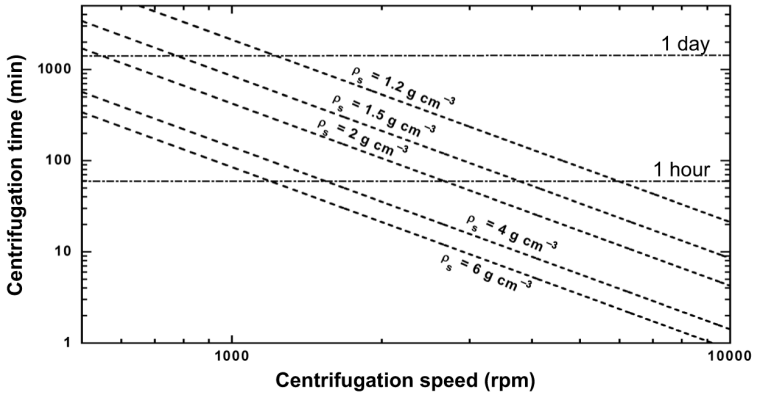
4. Фигура 1 представя променливостта във времето на центрофугиране (t) спрямо скоростта на центрофугиране (rpm) за различната плътност на почвите (ρ_s) (фигура 1а) и различните дължини на сместа в тръбите за центрофуга (фигура 1а). От фигура 1а се вижда въздействието на плътността на почвата; например за класическата центрофуга с 3 000 rpm, времето за центрофуга е приблизително 240 min за 1,2 g cm плътност на почвата, докато само 50 min за 2,0 g cm^3. По подобен начин от фигура 1б за класическата центрофуга с 3 000 rpm, 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.

▼B

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 μm 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.

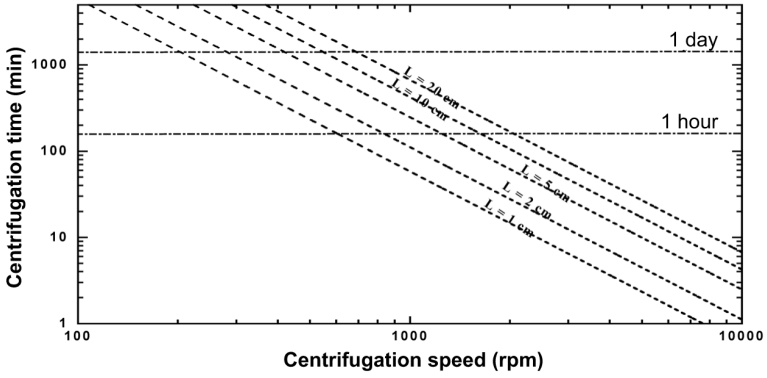
   Ако извършващата лаборатория има техника за ултрацентрофуга или ултрафилтрация, адсорбцията/десорбция на веществото в почвата може да се изследва в по-голяма дълбочина, включително информация за адсорбцията на веществото върху колоидите. В този случай, за да се разделят трите фази почва, колоиди и разтвор, се използва апаратура за ултрацентрофуга от 60 000 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 cm, R_b-R_t= 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} и ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} при 25 °C.

Фигура 1б



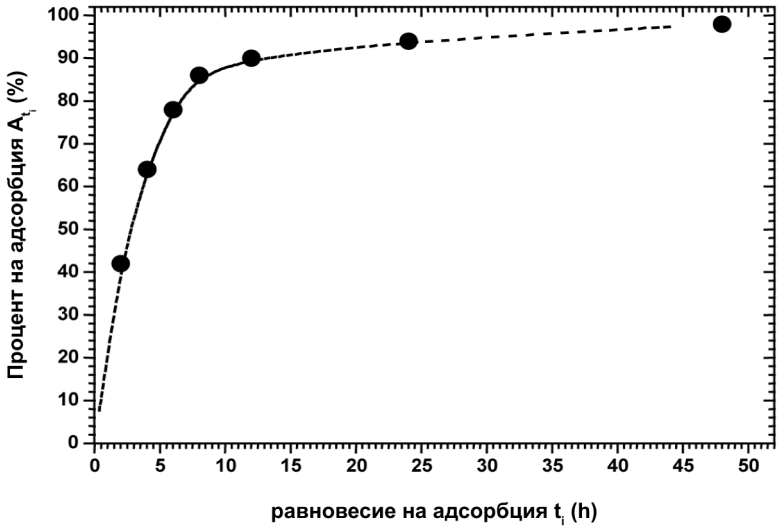
Променливост на времето за центрофуга (t) противоположно на скоростта на центрофуга (rpm) за различната дължина на сместа в тръбата за центрофуга (R_b-R_t) = L; R_t= 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1}, ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} при 25 °C и ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

Приложение 5

ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА АДСОРБЦИЯТА A (%) 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 A (A %)

а) *Паралелен метод*

Процентът адсорбция се изчислява за всяка използвана епруветка (i) за определено време (t_i), в съответствие с уравнението: ([1])

$$A_{t_i} = \frac{m_p^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)^1$$

Периодът може да се изчисли, както следва:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_p^{ads}(t_i) = m_0 - C_{vod}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

където:

A_{t_i} = процента адсорбция (%) при определено време t_i;

$m_p^{ads}(t_i)$ = 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);

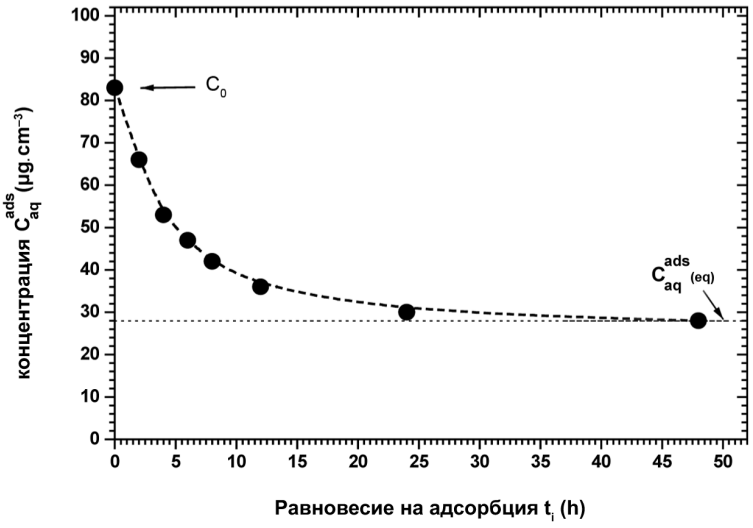
C_o = първоначалната маса на тествания разтвор в контакт с почвата (μg cm^{-3});

▼B

$C_{vod}^{ads}(t_i)$ = съдържанието на тестваното вещество във водната фаза при определено време t_i на извършване на теста (μg cm^{-3}); така концентрацията се определя аналитично, като се взимат предвид стойностите, дадени по време на пускането на празен ход.

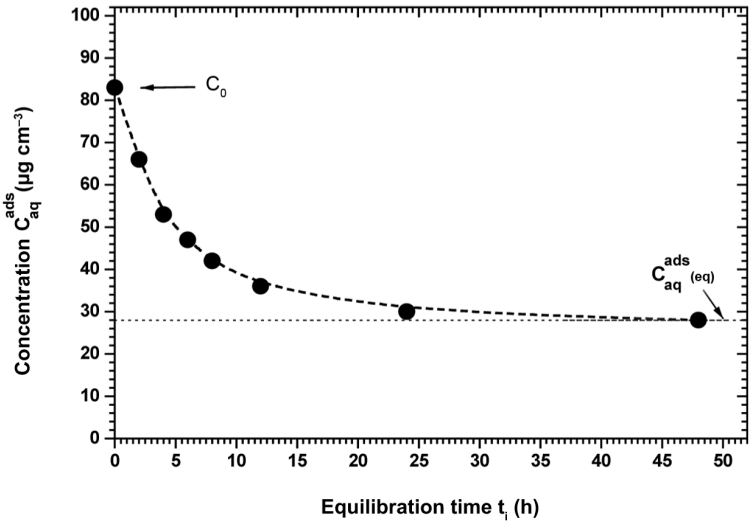
V_0 = първоначално количество на тествания разтвор в контакт с почвата (cm^3).

Стойностите на процента адсорбция A_{t_i} или $C_{vod}^{ads}(t_i)$ 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 $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_p^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

— за втория часови интервал $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_p^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

— за третия часови интервал $\Delta t3 = t_3 - t_2$

$$m_p^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

— за n-ти часови интервал $\Delta tn = tn - tn-1$

$$m_p^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{\left(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A \right)}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

— Процентът на адсорбция при всеки интервал от време $A_{\Delta t_i}$ се изчислява, като се използва следното уравнение:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_p^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (8)^1$$

докато процента на адсорбция A_{t_i} за време t_i е дадено с уравнението:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)^1$$

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:

$$m_p^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_p^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)^1$$

▼B

— масата на тестваното вещество в разтвора е:

$$m_{vod}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)^1$$

— и процентът на адсорбция при постигане на равновесие е:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (12)^1$$

Използваните по-горе параметри се определят като:

$m_p^{ads}(\Delta t_1), m_p^{ads}(\Delta t_2), ..., m_p^{ads}(\Delta t_n)$ = масата вещество, адсорбирано върху почвата за интервали от време Δt_1, Δt_2,..., Δt_n (μg);

$m_m^{ads}(t_1)$, $m_m^{ads}(t_2)$, ..., $m_n^{ads}(t_n)$ = масата вещество, измерено в аликвотна част v_a^A за определено време t_1, t_2,..., t_n съответно (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = маса на адсорбираното вещество върху почвата при равновесие на адсорбция μg;

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = 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_1 (%)

A_{eq} = процент на адсорбция при равновесие на адсорбция (%).

ДЕСОРБЦИЯ (%)

Времето t_0, когато започва експериментът на кинетиката на дезорбция, 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 $CaCl_2$ разтвор.

а) *Паралелен метод*

При определено време t_i масата на тествано вещество се измерва във водната фаза, взето от епруветка i ($\left(V_r^i\right)$) и масата на десорбция се изчислява съгласно уравнението:

$$m_{vod}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i}\right) - m_{vod}^{A} \quad (13)$$

При равновесие на десорбция $t_i = t_{eq}$ и следователно $m_{vod}^{des}(t_i) = m_{vod}^{des}(eq)$.

Масата на десорбираното вещество при интервал от време Δt_i е даден в уравнението:

$$m_{vod}^{des}(\Delta t_i) = m_{vod}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{vod}^{des}(j) \quad (14)$$

Процентът на десорбция се изчислява:

при определено време t_i с уравнението:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{vod}^{des}(t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (15)$$

и при интервал (Δt_i) с уравнението:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{vod}^{des}(\Delta t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (16)$$

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 (%);

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = масата на тестваното вещество, десорбирано при интервал от време t_i (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ = масата на тестваното вещество, десорбирано при интервал от време Δt_i (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = 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 адсорбация заради непълното заместване на количеството (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{vod}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = 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 $\left(v_a^A\right)$ 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 ($V_т$) по време на експеримент за кинетиката на десорбция остава постоянно и е дадено в уравнението:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^{\ A}(i) \quad (18)$$

▼B

При време t_i:

— масата на тестваното вещество се измерва в малка аликвотна част $\left(v_a^D\right)$ и десорбната маса се изчислява съгласно уравнението:

$$m_{vod}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{vod}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— при равновесие на десорбция $t_i = t_{eq}$ и следователно $m_{vod}^{des}(t_i) = m_{vod}^{des}(eq)$.

— Процентът на десорбция D_{t_i} се изчислява чрез следното уравнение:

$$D_{t_i} = \frac{m_{vod}^{des}(t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

При интервал от време Δt_i:

По време на всеки интервал от време количеството десорбирано вещество се изчислява, както следва:

— за първия часови интервал $\Delta t_i = t_1 - t_0$

$$m_{vod}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{vod}^{A} \text{ а } m_p^{des}(t_1) = m_p^{vod}(eq) - m_{vod}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— за втория часови интервал $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{vod}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{vod}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{vod}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right)$$

$$m_p^{des}(t_2) = m_p^{ads}(eq) - \left[m_{vod}^{des}(\Delta t_1) + m_{vod}^{des}(\Delta t_2)\right] \quad (22)$$

— за n-ти часови интервал $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{vod}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{vod}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{\left(V_T - (n-i) \cdot v_a^D\right)}{V_T} \cdot m_{vod}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \text{ и}$$

$$m_p^{des}(t_n) = m_p^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n} m_{vod}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Накрая при всеки интервал от време $D_{\Delta t_i}$ се изчислява със следното уравнение:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{vod}^{des}(\Delta t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (24)$$

докато процентът на десорбция D_{t_i} при време t_i е даден чрез следното уравнение:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

▼B

където гореспоменатите параметри се определят, както следва:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = масата вещество, останало адсорбирано върху почвата след интервали от време Δt_1,Δt_2,..., Δt_n респективно (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = масата вещество, останало адсорбирано върху почвата след интервали от време Δt_1, Δt_2,..., Δt_n респективно (μg);

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = масата вещество, измерено в аликвотна част $\left(v_a^D\right)$ за определено време t_1, t_2,..., 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);

$$m_{vod}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{vod}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

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);

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

Приложение 6

АДСОРБЦИЯ-ДЕСОРБЦИЯ В ПОЧВАТА: ФОРМУЛЯР ЗА ОТЧИТАНЕ

Изследвано вещество:

Изследвана почва:

Съдържание на суха маса в почвата (105 °C, 12 h): %

Температура: °C

Приложимост на аналитичния метод

Претеглена почва	g	
Почва: суха маса	g	
Обем на разтвор на $CaCl_2$	cm^3	
Нормална концентрация на крайния разтвор	$\mu g\ cm^{-1}$	
Аналитична концентрация на крайния разтвор	$\mu g\ cm^{-1}$	

Принцип на използвания аналитичен метод:

Калибрация на аналитичния метод:

Изследвано вещество:

Изследвана почва

Съдържание на суха маса в почвата (105 °C, 12 h): ..... %

Температура: ..... °C

Използван аналитичен метод: Непряк ☐ Паралелен ☐ Сериен ☐

Пряк ☐

Тест за сорбция: тестови проби

	Знак	Единици	Време на равновесиет 0		Време на равновесиет 0		Време на равновесиет 0		Време на равновесиет 0	
Епруветка №										
Претеглена почва	—	g								
Почва: суха маса	$m_{почва}$	g								
Обем вода в претеглената почва (изчислено)	V_{ws}	cm^3								
Обем на разтвор 0,01M на $CaCl_2$ за изравняване на почвата		cm^3								
Обем на основния разтвор		cm^3								
Пълен обем на водната фаза при контакт с почвата	V_0	cm^3								
Начална концентрация на тестовия разтвор	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Маса на тестваното вещество в началото на теста	m_0									

▼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	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg 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	$cm^3.g^{-1}$								
Средства										
Коефициент на адсорбция	K_{oc}	$cm^3.g^{-1}$								
Средства										

Тествано вегцество:

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		μg cm^{-3}						
След разбъркване и центрофугиране								
Концентрация във водната фаза		μg cm^{-3}						

Забележка: Добавете колони, ако е необходимо.

Тествано вещество:

Тествана почва:

Съдържапие па суха маса в почвата (105 °C. 12 Ь): ..... %

Температура: ..... °C

Баланс на масата

	Знак	Единици				
Епруветка №						
Претеглена почва	—	g				
Почва: суха маса	$m_{почва}$	g				
Обем на водата в претеглената почва (изчислено)	V_{ws}	ml				
Обем на 0,01 M 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 тестовия разтвор	*C0*	μg.cm^{-3}				
Време на равновесието	—	h				
След разбъркване и центрофугиране						
Концентрация на тестваното вещество при водната фаза, включително и корекция на празна проба	$C_{aq}^{ads}(eq)$	|μg.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}	μg.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}	$\mu g.cm^{-3}$				
Маса на веществото, екстрахирано от почвата и от стените на съда	τ_{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		$\mu g.cm^{-3}$								
Равновесие на адсорбцията	—	h								

▼B

	Символ	Единица								
След разбъркване и центрофугиране										
Концентрация на тестваното вещество при водната фаза, включително и корекция на празна проба	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm-								
Температура		°C								
Маса на адсорбцията за единица почва	$C_s^{ads}(eq)$	µg-g^{-1}								

Регресен анализ:

стойност K_F^{ads}:

стойност на l/n:

регресен коефициент r^2:

Тествано вещество:

Тествана почва:

Съдържание на суха маса в почвата (105 °C, 12 h): ..... %

Температура: ..... °C

Използва се аналитичният метод: Непряк ☐ Пряк ☐ Паралелен ☐ Сериен ☐

Тест за десорбция

		Символ	Единица	Времеви интервал	Времеви интервал	Времеви интервал	Времеви интервал
Епруветка № 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 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Пълен 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 l_i		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Обем на разтвора взет от епруветка 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 *1,* (изчислено)		$m_{vod}^{des}(t_i)$	µg				
Маса на веществото отделено от почвата във времеви интервал $Delta_{li}$ (изчислено)		$m_{vod}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Символ	Единица	Времеви интервал	Времеви интервал	Времеви интервал	Времеви интервал
Процент на десорбцня						
Десорбция във време l_i	D_{ti}	%				
Десорбция във времеви интервал *Am,*	$D_{\Delta t_i}$	%				
Видим коефициент на десорбция	K_{des}					

PM: паралелен метод

SM: сериен метод

▼B

B.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 B.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 n-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 замести експерименти за равновесие на подбора, използван при метод на тестване B.18. Обаче изчисленият K_{oc} може да е полезен при избиране на подходящи параметри за проучванията на адсорбция/десорбция, съгласно метод B.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.

$$K_d = \frac{C_{почва}}{C_{вода}} или \frac{C_{утайка}}{C_{вода}} \quad (1)$$

където:

$C_{почва}$ = концентрация тествано вещество в почвата при равновесие (μg g^{-1})

$C_{утайка}$ = концентрация тествано вещество в утайките при равновесие (μg g^{-1})

$C_{вода}$ = концентрация тествано вещество във водната фаза при равновесие (μg g^{-1}, μg 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 $C_{вода}$ във водната фаза е равна на едно; единиците са μg g^{-1} сорбиращо вещество. Стойността може да варира със свойствата на сорбиращото вещество.

$$\log\frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n}\cdot\log C_{aq} \quad (2)$$

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

$C_{вода}$ = концентрация тествано вещество във водната фаза при равновесие (μg ml^{-1})

ПРИ $C_{вода} = 1; \log K_f = \log\frac{x}{m}$

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 μg g^{-1} органични частици.

$$Koc = \frac{Kd}{foc}(\text{без изменение или в ml}\cdot g^{-1}) \text{или} \frac{Kf}{foc}(\mu g\cdot g^{-1}) \quad (3)$$

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_{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_o = 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.

$$Pow = \frac{Coктанол}{Cвода}(= Kow) \quad (5)$$

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.

▼B

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:

-O -Si	— CH_2 — CH_2 — CH_2	— CN
силициев двуокис	неполярна част	полярна половина

Принципът на метода на теста е подобен на метода на тестване A.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-нафтиламин),

— ароматни естери на карбоксилните киселинни (например: метилестер на бензонената киселина, 3,5- естер динитробензонената киселина),

— ароматни хидрокарбони (например толуол, ксилол, етилбензол, нитробензол),

— естери на арилоксифеноксипропиоловите киселинни (например диклофоп-метил, феноксапроп-етил, феноксапроп-P-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 въглеводороди (например ендосулфан, дихлордифенил-трихлоретан, хексахлорбензен, квинтозен, 1,2,3-трихлорбензен),

— органофосфор инсектициди (например азинфос-метил, дизулфотон, 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 прилагат за вещества, които взаидействат 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 ± 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. **Повтарямост**

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 M 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 (Koc) 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.

▼B

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.

▼B

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)
Изопротурон	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-HCH (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	(a)
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 prumyslem.

▼B

B.20. ТЕСТ ЗА ВЪЗПРОИЗВЕЖДАНЕ НА ГИГАНТСКА ВОДНА БЪЛХА

1. МЕТОД

Този метод е точно копие на OECD TG 211 (1998).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Първоначалната цел на теста е оценяване въздействието на химикалите върху репродуктивната способност на *Daphnia magna* (гигантска водна бълха).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ЕДИНИЦИ

Родителско животно: са тези женски животни от *Daphnia magna*, които са представени в началото на експеримента и чиято репродуктивна способност е обект на проучването.

Поколение: са младите *Daphnia magna*, произлезли от родителското животно по време на теста.

Концентрация на най-ниско наблюдаваното въздействие (LOEC): е най-ниската тествана концентрация, при която се наблюдава, че веществото статистически определено има значително въздействие върху репродуктивната способност и смъртността на родителското животно (при $p < 0,05$) в сравнение с контролната по време на определено излагане. Обаче всички тествани концентрации над LOEC трябва да имат вредно въздействие, равно или по-голямо от това, което се наблюдава при LOEC. Когато тези две условия не могат да се изпълнят, трябва да се даде пълно обяснение за това как LOEC (и следователно NOEC) са били избрани.

Концентрация на ненаблюдавано въздействие (NOEC): това е тестваната концентрация непосредствено преди LOEC, която в сравнение с контролната статистически няма значително въздействие (при $p < 0,05$) по време на определено излагане.

$\mathbf{EC_X}$: е концентрацията на тестваното вещество, разтворено във вода, което има за резултат x % намаляване в репродуктивността на *Daphnia magna* по време на определено излагане.

Вътрешна скорост на увеличаване: е мярка за растеж на популацията, която интегрира репродуктивната способност и смъртността (20) (21) (22). При постоянно състояние на популацията тя е нула. При нарастваща популация е положителна, а при намаляваща популация е отрицателна. Последната не е устойчива и накрая води до прекратяване.

Граница на откриваемост: е най-ниската концентрация, която може да се открие, но не може да се определи количествено.

Граница на определяне: е най-ниската концентрация, която може да се измери количествено.

Смъртност: животно, което е записано като мъртво, когато е неподвижно, т.е. когато не е способно да плува или ако не се наблюдава движение на външните органи и корема след 15-секундно леко разтърсване на съда за тестване. (Ако се използва друга дефиниция, това трябва да се отчете заедно с нейната референция.)

▼B

1.3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА НА ТЕСТВАНЕ

Млади женски животни *Daphnia magna* (родителски животни) на възраст по-малко от 24 часа при започването на теста се излагат на тестваното вещество, прибавено към водата при поредица от концентрации. Продължителността на теста е 21 дни. В края на теста се оценява общият брой живо поколение, произлязло от живо родителско животно в края на теста. Това означава, че младите индивиди, произлезли от възрастните индивиди, които са умрели по време на теста, се изключват от изчисленията. 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 се е наблюдавало поколение), но тези начини трябва да се отчетат като допълнение към общия брой от млади индивиди, произлезли от родител, който е жив в края на теста. С цел да се определи концентрация на най-ниското наблюдавано въздействие (LOEC) и следователно концентрация на ненаблюдавано въздействие (NOEC), репродуктивната способност на животните, изложени на тестваното вещество, се сравнява с тази на контролните животни. С цел да се оцени концентрацията, която би причинила x % намаляване в репродуктивността (т.е. EC_{50}, EC_{20} или EC_{10}), като допълнение данните се анализират колкото е възможно по скоро чрез използване на модела на регресия.

Оцелелите от родителските животни и времето на появяване на първото поколение трябва да се запише. Други въздействия върху параметрите, свързани с веществото, като растеж (например дължина) и възможна вътрешна скорост на увеличаване, също могат да се изследват.

1.4. ИНФОРМАЦИЯ ЗА ТЕСТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

Резултатите от теста за остра токсичност (вж. метод B.2, част 1), извършен с *Daphnia magna*, следва да са на разположение. Резултатът може да е полезен при избиране на подходящ обхват на тестваните концентрации при репродуктивния тест. Разтворимостта във вода и парното налягане при тестваното вещество следва да са известни и да е на разположение сигурен аналитичен метод за класифициране на веществото в тествания разтвор, с отчетена ефективност при възстановяване и граница на откриваемост.

Информацията за тестваното вещество, която може да е полезна при създаване на условията за провеждане на теста, включва формула на структурата, чистота на веществото, устойчивост при светлина, устойчивост при условията на теста, pKa, P_{ow} и резултатите от теста за готовата биоразложимост (вж. метод B.4).

1.5. ВАЛИДНОСТ НА ТЕСТА

За да бъде тестът валиден, при контролите следва да се изпълнят следните критерии:

— смъртността на родителските животни (женските *Daphnia magna*) да не превишава 20 % в края на теста,

— основният брой живо поколение, произлязло от оцеляло в края на теста родителско животно, да е ≥ 60.

1.6. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА НА ТЕСТА

1.6.1. **Апаратура**

Съдовете за теста и другата апаратура, които ще влизат в контакт с тествания разтвор, следва да са направени изцяло от стъкло или други инертни материали. Съдовете за тестване нормално ще са от устойчиво стъкло.

Допълнително се изисква част или цялото оборудване, както следва:

— O_2 метър (с микроелектрод или друго подобно оборудване за измерване на разтворения кислород в проби с ниско количество),

▼B

— адекватна апаратура за контрол на температурата,

— pH метър,

— оборудване за определяне на твърдостта на водата,

— оборудване за определяне на концентрацията на органичен въглерод (TOC) във водата или оборудване за определяне на необходимостта от химичен кислород (COD),

— адекватно оборудване за контрол на режима на светлина и измерването на интензитета на светлината.

1.6.2. **Тествани организми**

Видовете, които ще се използват при теста, са видовете *Daphnia magna* Щраус. Другите видове *Daphnia* могат да се използват, при условие че съответно отговарят на критериите за валидност (критериите за валидност по отношение на репродуктивната способност при контролите са релевантни за *Daphnia* видовете). Ако се използват други видове *Daphnia*, те трябва ясно да се идентифицират и да се посочат причините за тяхната употреба.

За предпочитане е клонингът да се идентифицира чрез генотипа. Проучване (1) показва, че характеристиката за репродуктивността от клонинг A (която произлиза от IRCHA във Франция) (3) постоянно отговаря на критериите за валидност посредством ≥ 60 животни поколение на родителско животно, оцеляло при условията, описани в този метод. Обаче други клонинги се допустими, при условие че *Daphnia* е показала, че отговаря на критериите за валидност на теста.

В началото на теста животните следва да са на възраст по-малко от 24 часа и не трябва да са първо поколение. Те следва да са произлезли от здраво стадо (т.е. такова, което не показва признаци на стрес, като висока смъртност, присъствие на мъжки и ефипия, закъснение при създаване на първото поколение, безцветни животни и т.н.). Стадото животни трябва да се отглежда в условия (светлина, температура, среда, хранене и животни на единица обем), подобни на тези, които ще се използват при теста. Ако средата на отглеждане на *Daphnia*, която се използва при теста е различна от тази, която е използвана за обикновеното отглеждане на *Daphnia*, добре е да се включи преди теста един период на аклиматизация от обикновено три седмици (т.е. едно поколение), за да се избегне подлагането на стрес на родителските животни.

1.6.3. **Среда на извършване на теста**

Препоръчва се при този тест да се използва изцяло определена среда. Това може да предотврати употребата на добавки (например водорасли, екстракти от почвата и т.н.), които са трудни за характеризиране и следователно подобряват възможността за стандартизиране между лабораториите. Създадени са подходящи за тази цел среди на Elendt M4 (4) и M7 (вж. приложение 1). Обаче са допустими и други среди (например (5) (6), при условие че отглеждането на *Daphnia* показва, че отговаря на критериите за валидност на теста.

Ако се използват среди, които включват неопределени добавки, тези добавки следва да се определят ясно и при отчитането на теста следва да се предостави информация за състава, по-специално с оглед на съдържанието на въглерод, тъй като това може да съдейства при определяне на хранителния режим. Препоръчва се общият органичен въглерод (TOC) и/или необходимият химичен кислород (COD) на основната подготовка на органичните добавки да са определени и да е направена оценка на въздействието на TOC и COD върху средата, която се използва при теста. При този способ се препоръчва TOC нивото (т.е. преди добавянето на морски водорасли) да бъде под 2 mg/l (7).

▼B

Когато се тестват вещества, съдържащи метали, е важно да се знае, че свойствата на тестваната среда (например твърдост, способност за образуване на хелатен пръстен) могат да издържат токсичността на тестваното вещество. 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 средите на Elendt M4 и M7. И двете среди съдържат хелатообразуващ фактор EDTA (етилендиаминтетраоцетна киселина, комплексон III). Изследванията са показали, че (2) очевидната токсичност на кадмия е най-общо по-ниска, когато тестовете на репродуктивността се извършват при M4 и M7 среди, в сравнение със среди, които не съдържат EDTA. Следователно M4 иM7 не се препоръчват за тестване на веществата, които съдържат метали, и други способи, съдържащи известни хелагообразуващи фактори, също трябва да се избягват. За веществата, които съдържат метали, е препоръчително да се използва алтернативна среда, като например ASTM (Американско сдружение за изпитване и изследване на материалите) възстанови твърдата прясна вода (7), която не съдържа EDTA и е с прибавени екстракти от водорасли (8). Тази комбинация от ASTM, която възстановява твърдата прясна вода и добавени екстракти от водорасли, също е подходяща за продължително отглеждане и тестване на *Daphnia magna* (2), въпреки че тя все още проявява слабо хелатообразуващо действие заради органичната съставка на добавените екстракти от водорасли.

В началото и по време на теста концентрацията на разтворен кислород е над 3 mg/l. PH е в границата от 6 до 9 и обикновено не варира повече от 1,5 единици при всеки един тест. Препоръчва се твърдост над 140 mg/1 (като $CaCO_3$). Тестове при и над тези нива са показвали, че репродуктивността е в съответствие с критериите за валидност (9) (10).

1.6.4. **Тествани разтвори**

Тестваните разтвори на избраните концентрации обикновено се приготвят чрез разреждане на основния разтвор. Основният разтвор за предпочитане се приготвя чрез разреждане на веществото в средата за тестване.

С цел да се приготви устойчив концентриран основен разтвор, може в някои случаи да се наложи употребата на органични разтворители или диспергиращи вещества, но трябва да се положат всички усилия, за да се избегне употребата на такива материали. Примери на подходящи разтворители са ацетон, етанол, метанол, диметилформамид и триетилен гликол. Примери на подходящи разпръскващи вещества са Cremophor RH40, метилцелулоза 0,01 % и HCO-40. Във всички случаи тестваното вещество в тестваният разтвор следва да не превишава границата на разтворимост в тестваната среда.

Разтворителите се използват, за да се получи основният разтвор, който може да се дозира точно във водата. С препоръчаната концентрация разтвор и при финалната среда на тестване (т.е. ≤ 0,1 ml/1), изброените по-горе разтвори не са токсични и не повишават разтворимостта във вода на веществото.

Разпръскващите вещества могат да подпомогнат при точното дозиране и разпръскване. При препоръчаната концентрация в условията на последния тест (т.е. ≤ 0,1 ml/1) разпръскващите вещества, изброени по-горе, не са токсични и не повишават разтворимостта във вода на веществото.

▼B

1.7. ПЛАНИРАНЕ НА ТЕСТА

Следва да се определят съдовете за теста и да бъдат направени на случаен принцип всички последващи манипулации. Неизпълнението на тези действия може да доведе до отклонение, което може да се изтълкува погрешно като въздействие от концентрацията. По-специално, ако експерименталните единици се управляват по реда на обработката и концентрацията, тогава някои ефекти, относими към времето, като умората на оператора или други грешки, могат да доведат до по-големи въздействия при по-високите концентрации. Нещо повече, ако е вероятно резултатите от теста да са повлияни от първоначалните условия или условията на околната среда по време на теста, такива като местонахождение на лабораторията, следва да се помисли за спиране на теста.

1.8 ПРОЦЕДУРА

1.8.1. **Условия на експозиция**

1.8.1.1. *Продължителност*

Тестът продължава 21 дни.

1.8.1.2. *Зареждане*

Родителските животни се обслужват индивидуално, едно за един съд за тестване, с 50 — 100 ml от средата на всеки съд.

За да се постигнат изискванията на аналитичната процедура, използвана при определяне на концентрацията тествано вещество, понякога може да са необходими по-големи обеми, въпреки че е допустимо и обединяването на дублиращите съдове за химически анализи. Ако се използва количество, по-голямо от 100 ml, може да се наложи да се повиши съотношението, дадено за *Daphnia*, за да се гарантира достатъчен достъп на храна и съответствие с критериите за валидност. За потоковите тестове може да се помисли за алтернативно планиране, по технически причини, (например четири групи от 10 животни в по-голям обем), но следва да бъдат отчитани всякакви промени в планирането на теста.

1.8.1.3. *Брой животни*

За полустатичните тестове се използват най-малко 10 животни, разделени поотделно за всяка тествана концентрация, и най-малко 10 животни, разделени поотделно в контролните серии.

За потоковите тестове се установява за уместно да се използват 40 животни, разделени на четири групи от 10 животни за всяка тествана концентрация (1). По-малък брой от тествани организми може да се използва и се препоръчва минимум 20 животни за концентрация, разделени на две или повече контролни групи с равен брой животни (например четири контролни групи, като всяка съдържа пет водни бълхи). За отбелязване е, че за тестове, където животните са държани в групи, ако родителското животно умре, няма да е възможно да се отчете репродуктивната способност като общ брой оцеляло поколение, произлязло от родителско животно, което е живо в края на теста. В тези случаи репродуктивната способност се изразява като общ брой живо поколение, произлязло от родителите, които са били живи в началото на теста.

1.8.1.4. *Хранене*

За полустатичните тестове храненето за предпочитане се прави дневно, но поне три пъти на седмица (т.е. съответстващи на измененията в средата). Отклоненията от това (например за потоковите тестове) следва да бъдат отчитани.

▼B

По време на теста хранителният режим на родителските животни за предпочитане са живи клетки от морски водорасли или едно или повече от следните: *Chorella* sp, *Selenastrum capricornutum* (сега *Pseudokichneriella subcapitata* (11) и *Scenedesmus subspicatus*. Хранителният режим, който се прилага, следва да се основава на количеството органичен въглерод (C), осигурен за всяко родителско животно. Проучванията (12) показват, че за *Daphnia magna* нива на съотношение между 0,1 и 0,2 mg C/*Daphnia*/ден са достатъчни за получаването на изисквания брой поколение, за да се покрият критериите за валидност на теста. Съотношението може да се получи или при постоянна пропорция по време на теста, или, ако е желателно, може да се използва по-ниска пропорция в началото на теста, която да се повиши по време на извършването на теста, като се вземе предвид растежът на родителските животни. В този случай съотношението 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 съотношение (т.е. за удобство, тъй като измерването на органичния въглерод изисква време) трябва да се използват заместващи мерки, такива като брой на клетките от морски водорасли или слаба адсорбция, всяка лаборатория трябва да има собствена номограма, която се отнася до заместващия начин на измерване на органичния въглерод на морските водорасли (вж. приложение 2 за съвети при създаването на номограма). Номограмите се проверяват поне веднъж годишно и по-често, ако условията за отглеждане на морските водорасли са се променили. Установено е, че слаба адсорбция е по-добър заместител на съдържанието на въглерод, отколкото броят на клетките (13).

За да се минимизира количеството отглеждани морски водорасли, прехвърлени в съдовете за тестване, за *Daphnia* се поддържа концентрирана суспензия на морските водорасли. Концентрацията на морските водорасли може да се постигне чрез центрофуга, последвана от ресуспензия на дестилирана вода, дейонизирана вода или среда на *Daphnia* културата.

1.8.1.5. *Светлина*

16 часа светлина при интензитет, непревишаващ 15 — 20 μE m^{-2} s^{-1}

1.8.1.6. *Температура*

Температурата на средата, при която се извършва тестът, е в граници от 18 — 20 °C. Обаче за всеки един тест температурата не следва да се изменя, ако е възможно, с повече от 2 °C извън тези ограничения (например 18 — 20, 19 — 21 или 20 — 22 °C). Може да е подходящо използването на допълнителни съдове за теста за целите на мониторинга на температурата.

1.8.1.7. *Проветряване*

По време на теста съдовете не се проветряват.

1.8.2. **Тествана концентрация**

Обикновено следва да са налични поне пет тествани концентрации, подредени в геометрични серии с фактор на разделяне, за предпочитане не превишаващ 3,2, и се използва подходящият брой контроли за всяка тествана концентрация (вж. точка 1.8.1.3). Посочват се причините за използването на по-малко от пет концентрации. Не се тестват вещества над тяхната граница на разтворимост в тестваната среда.

▼B

При определяне границите на концентрация се взема предвид следното:

i) ако целта е постигане на LOEC/NOEC, най-ниската концентрация трябва да е достатъчно ниска, така че плодовитостта при тази концентрация да не е значително по-ниска от тази при контролната. Ако случаят не е такъв, тестът трябва да се повтори с намалена най-ниска концентрация;

ii) ако целта е постигане на LOEC/NOEC, най-високата концентрация трябва да е достатъчно висока, така че плодовитостта при тази концентрация да е значително по-ниска от тази при контролната. Ако случаят не е такъв, тестът трябва да се повтори с повишена най-висока концентрация;

iii) ако е изчислено EC_X за въздействието върху репродуктивността, се препоръчва да се използват достатъчни концентрации, за да се определи EC_X с подходящо ниво на увереност. Ако е изчислено EC_{50} за въздействието върху репродуктивността, се препоръчва най-високата концентрация да е по-висока от тази EC_{50}. Иначе, въпреки че все пак е възможно да се изчисли EC_{50}, интервалът на увереност по отношение на EC_{50} е много широк и няма да е възможно да се оцени задоволително приложимостта на съответния модел;

iv) границите на тестваната концентрация е за предпочитане да не включват никакви концентрации, които статистически имат значително въздействие върху оцеляването на възрастните индивиди, тъй като това би променило природата на теста от обикновен тест за репродуктивност до сложен тест за репродуктивност и смъртност, изискващ много повече сложни статистически анализи.

Предварителните познания за токсичността на тестваното вещество (например от акутен тест и/или от сведения от проучвания на обхвата) ще помогнат при избора на подходящи концентрации за изследване.

Където се използва разтвор или разпръскващо вещество, за да се подпомогне разтворът за тестване (вж. точка 1.6.4), неговата последна концентрация в съда за тестване не следва да е по-висока от 0,1 ml/l и следва да е една и съща във всички съдове за тестване.

1.8.3. **Контроли**

Допълнително към сериите от теста, по средата на теста се използва една контролна серия и също, ако е уместно, една контролна серия, съдържаща разтвор или разпръскващо вещество. Когато се използва такава серия, концентрацията на разтворителя или на разпръскващото вещество следва да е същата като използваната в съда, съдържащ тестваното вещество. Използват се подходящ брой дублиращи серии (вж. точка 1.8.1.3).

Най-общо, при добре проведените тестове коефициентът на променливост спрямо основния брой живо поколение, произлязло от едно родителско животно в контролната(ите) серия(и), следва да бъде ≤ 25 и това се отчита, при планирането на теста чрез използване на самостоятелно отглеждани животни.

1.8.4. **Възстановяване на средата за тестване**

Честотата на възстановяването на средата зависи от устойчивостта на тестваното вещество, но това следва да бъде поне три пъти на седмица. Ако от предварителните тестове за устойчивост (вж. точка 1.4), концентрацията тествано вещество не е стабилна (т.е. е извън обхвата от 80 — 120 % от номинала или пада под 80 % от измерената първоначална концентрация) за по-дълго време от максималния период на възстановяване (т.е. три дни), се вземат мерки за по-често възстановяване на средата или за използване на потоков тест.

▼B

Когато средата се е възстановила при полустатичните тестове, се подготвя втора серия от съдове за тестване и родителските животни се прехвърлят в тях чрез например стъклена пипета с подходящ диаметър. Количеството прехвърлена среда с *Daphnia* се минимизира.

1.8.5. **Наблюдения**

Резултатите от наблюденията, направени по време на теста, се записват върху таблици (вж. примерите в приложения 3 и 4). Ако се изискват други измервания (вж. 1.3 и 1.8.8), се правят допълнителни наблюдения.

1.8.6. **Поколение**

За да не се консумира храната, предназначена за възрастния индивид, поколението, произлязло от едно родителско животно, е за предпочитане да се отстранява и всекидневно да се преброява след появяването на първото потомство. За целите на този метод се преброява само живото поколение, но наличието на недоразвити яйца или мъртво поколение също следва да бъде отчитано.

1.8.7. **Смъртност**

За предпочитане е смъртността между родителските животни да се записва всеки ден поне по едно и също време с времето, когато се преброява поколението.

1.8.8. **Други параметри**

Въпреки че този метод принципно е планиран да оценява въздействието върху репродуктивността, е възможно задоволително да се определят и други въздействия, за да се позволи статистически анализ. Желателно е измерване на растежа, тъй като се набира информация за възможните сублетални въздействия, които може да са по-полезни, отколкото измерването само на репродуктивността; препоръчва се в края на теста да се измери дължината на родителските животни (т.е. дължината на тялото, като се изключи краят на гръбнака). Други параметри, които могат да се измерват или изчисляват, са времето за произвеждане на първото поколение (и следващите), броят и размерът на поколението по животни, броят на неразвитото поколение, наличието на мъжки или ефипии и присъщата скорост на повишаване на популацията.

1.8.9. **Честота на аналитичните определяния и измервания**

Поне веднъж в седмицата се измерват стойностите на концентрацията на кислород, температурата, твърдостта и pH, в прясна и стара среда, в контролите и при най-високата концентрация на тестваното вещество.

По време на теста концентрацията на тестваното вещество се определя на равни интервали.

При полустатичните тестове, където концентрацията на тестваното вещество се очаква да остане в рамките на ± 20 % от номинала (т.е. в обхвата 80 — 120 % — вж. 1.4 и 1.8.4), се препоръчва да се анализират като минимум най-високата и най-ниската концентрация на тестване, когато са току-що приготвени и по време на възстановяването през първата седмица на теста (т.е. прави се анализ на пробите от същия разтвор — когато са току-що приготвени и при възстановяването). След това се повтарят на интервали от поне една седмица.

▼B

За тестове, където концентрацията на тестваното вещество не се очаква да остане под ± 20 % от номинала, е необходимо да се анализират всички концентрации на тестване, когато са току-що приготвени и при възстановяване. Обаче за тези тестове, където измерената първоначална концентрация на тестваното вещество не е ± 20 % от номинала, но има достатъчно доказателства, които показват, че първоначалните концентрации са повторяеми и устойчиви (т.е. в обхвата от 80 — 120 % от първоначалната концентрация), се намалява определянето на химикалите от втората и третата седмица на теста до най-високата и най-ниската тествана концентрация. Във всички случаи определянето на концентрацията тествано вещество се извършва само при дублиращия съд за всяка тествана концентрация, преди възстановяването.

Ако е ползван потоков тест, е подходящ режим на пробите, подобен на този, описан за полустатичните тестове (но измерването на стари разтвори не се прилага в този случай). Обаче е препоръчително да се увеличи броят на вземането на проби по време на първата седмица (например три измервания), за да се гарантира, че тестваните концентрации остават устойчиви. При тези видове тестове дебитът на разтворителя и тестваното вещество се проверяват всеки ден.

Ако има доказателство, че концентрацията тествано вещество, която се изследва, е била задоволително поддържана в ± 20 % от номинала или измерената първоначална концентрация по време на теста, то резултатите могат да се основават на номинала или на измерените първоначални стойности. Ако отклонението от номинала или измерената първоначална концентрация е по-голямо от ± 20 %, резултатите се изразяват с оглед на натовареното средно време (вж. приложение 5).

2. ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

2.1. ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Целта на този тест е да се определи въздействието на тестваното вещество върху общия брой живо поколение за едно родителско животно, което е останало живо до края на теста. Общият брой живо поколение за едно родителско животно се изчислява за всеки съд за тестване (т.е. дублиращ). Ако при някои от дублиращите съдове по време на теста родителското животно умре или се окаже мъжки индивид, то дублиращото животно се изключва от анализа. Анализът тогава ще се основава на намаления брой дублиращи животни.

За оценяването на LOEC и следователно NOEC за въздействието на химикала върху репродуктивната способност е необходимо да се изчисли основната репродуктивна способност между дублиращите за всяка концентрация и свързаните остатъчни стандартни отклонения и това може да бъде направено, като се използва анализът на променливостта (ANOVA). Средната стойност на всяка тествана концентрация трябва следователно да се сравни с контролната средна стойност, като се използва подходящ метод за многократно сравняване. Тестовете на Дънет и Уилям могат да се използват (14) (15) (16) (17). Необходимо е да се провери дали ANOVA предположение за хомогенност на променливостта се запазва. Препоръчва се това да се направи по-скоро графично, отколкото чрез тест за формална значимост (18); подходяща алтернатива е тестът на Барлет. Ако това предположение не издържи, тогава се предпочита преобразуването на данните за променливост на хомогенността пред извършването на ANOVA или утежнена ANOVA. Размерът на въздействието, което се определя чрез използването на ANOVA (т.е. последната значителна разлика), се изчислява и отчита.

▼B

За оценка на концентрацията, която причинява 50 % намаляване на репродуктивната способност (т.е. EC_{50}), подходяща крива, например логистична крива, следва да е съобразена с данните чрез използване на статистическия метод, като например последните квадрати. Параметрите на кривата се определят, така че EC_{50} и неговите статистически грешки да могат да се оценят директно. Това много ще улесни изчисляването на границата на сигурност за EC_{50}. Освен ако няма основание да бъдат предпочетени различни граници на сигурност, позоваването следва да се прави при двустранни 95 % граници на сигурност. Съответстващата процедура преди всичко предоставя средството за оценка на значимостта на липсата на съответствие. Това може да се направи графично или чрез разделяне на остатъчната сума от квадрата в „липсата на съответствие“ и „компоненти на чиста грешка“ и извършване на специален тест за липса на съответствие. Тъй като за обработките, които дават висока плодовитост, е възможно да има голяма променливост в броя на произлезлите млади индивиди, отколкото обработките, които дават ниска плодовитост, за да се отрази на различната променливост при различните третирани групи, се предпочита компенсиране на наблюдаваните стойности (вж. за основна информация използвана литература (18)).

При анализа на данни от последния кръгов тест (2) логистичната крива се пригодява, като се използва следният модел, въпреки че може да се използват и други подходящи модели:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

където:

Y = общият брой млади индивиди за родителско животно, което е живо в края на теста (изчислени за всеки съд)

x = концентрация на веществото

c = очакван брой млади организми, когато x = 0

x_o = EC_{50} в популацията

b = параметри на наклона

Този модел е вероятно да бъде адекватен на голям брой ситуации, но все пак ще има тестове, за които няма да е подходящ. Следва да се прави проверка на валидността на модела, както бе предложено по-горе. В някои случаи може да е подходящ хормезен модел, при който ниските концентрации дават засилени ефекти (19).

Други концентрации, които оказват въздействие, като EC_{10} и EC_{20}, също могат да се изчисляват, въпреки че може да се предпочете използването на различни параметри на модела от тези, които са използвани за изчисляване на EC_{50}.

2.2. ОТЧИТАНЕ НА ТЕСТА

При отчитане на теста се включва следното:

2.2.1. **Тествано вещество**

— физическа природа и съответните физикохимични свойства,

▼B

— данни за химическата идентификация, включително чистота.

2.2.2. **Тествани видове**

— клонинг (независимо от това дали е генетичен вид), доставчик и източник (ако е известен) и използваните условия за отглеждане. Ако се използват видове, различни от *Daphnia magna*, това се отчита и се посочват причините за това.

2.2.3. **Условия, при които се извършва теста**

— използваната при теста процедура (т.е. полустатична или потокова, количество, зареждане на брой *Daphnia* за литър),

— период на излагане и интензитет на светлината,

— планиране на теста (т.е. брой на дубликатите, брой на родителите спрямо дубликатите),

— подробности за използваната среда за отглеждане,

— ако са използвани, добавки от органични материали, включително структура, източник, метод на приготвяне, TOC/COD на основния разтвор, оценка на резултатите на TOC/COD в тестваната среда,

— подробна информация за храненето, включително количеството (в mg C/*Dapnia*/ден) и разписанието (например вида на храната, включително характерното название на морските водорасли и, ако се знае, рода, условията на отглеждане),

— метода на подготовка на основните разтвори и честотата на подновяване (ако се използват разтвор и разпръскващо вещество, те трябва да са дадени, както и тяхната концентрация).

2.2.4. **Резултати:**

— резултатите от всички предварителни проучвания върху устойчивостта на тестваното вещество,

— номиналните тествани концентрации и резултатите от всички анализи, за да се определи концентрацията на тестваното вещество в съд за тестване (вж. пример на таблица с данни в приложение 4); отчитат се също ефикасността на метода за възстановяване и границата на определеност,

— качество на водата в съда за тестване (т.е. pH, температура и концентрация на разтворения кислород и TOC и/или COD и твърдост, където е необходимо) (вж. пример на таблица в приложение 3),

— целият записан брой живо поколение спрямо всяко родителско животно (вж. таблицата в приложение 3),

— брой на мъртвите сред родителските животни и денят, в който това се е случило (вж. таблицата в приложение 3),

— коефициент на променливост за контрол на плодовитостта (основан на общия брой живо поколение за родителско животно, което е останало живо в края на теста),

— графика на общия брой живо поколение на родителско животно (за всяка дублираща група), което е останало живо в края на теста, по отношение на концентрацията на тестваното вещество,

— най-ниско наблюдавано въздействие на концентрация LOEC за репродуктивността, включително описание на използваните статистически процедури и индикация за това, каква големина на въздействие може да се определи и ненаблюдавано въздействие на концентрация NOEC за репродуктивността; където това е подходящо; отчита се и LOEC/NOEC за смъртността на родителските животни,

▼B

— където е подходящо, EC_X за репродуктивността и интервалите на сигурност и графика за съответния модел, използван за изчисляване, наклон на кривата за реакция спрямо дозата и стандартната грешка,

— други наблюдавани биологически ефекти или измервания: отчитане на всички други биологични ефекти, които са били наблюдавани или измервани (например растеж на родителското животно), включително и съответното обосноваване,

— обяснение за всички отклонения от метода на теста.

3. **ПРЕПРАТКИ**

(1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20—21 March 1993.

(2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.

(3) Baird D. J., Barber J., Bradley M. C, Soares A. M. V. M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. Ecotoxicology and Environmental Safety, 21, pp. 257—265.

(4) Elendt B. P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, pp. 25—33.

(5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

(6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna.* Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, pp. 775—782.

(7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

(8) Baird D. J., Soares A. M. V. M., Girling A., Barber J., Bradley M. C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H. Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.), pp. 144—148.

(9) Parkhurst B. R., Forte J. L. and Wright G. P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna.* Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, pp. 1—8.

(10) Cowgill U. M. and Milazzo D. P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), pp. 185—196.

(11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.

(12) Sims I. R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, pp. 2053—2058.

▼B

(13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, pp. 459—466.

(14) Dunnett C. W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096—1121.

(15) Dunnett C. W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 482—491.

(16) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp. 103—117.

(17) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, pp. 510—531.

(18) Draper N. R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, pp. 93—96.

(20) Wilson E. O. and Bossert, W. H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

(21) Poole R. W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. McGraw-Hill Series in Population Biology, New York, pp. 532.

(22) Meyer J. S., Ingersoll C. G., McDonald L. L. and Boyce M. S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, pp. 1156—1166.

▼B

Приложение 1

ПОДГОТОВКА НА НАПЪЛНО ОПРЕДЕЛЕНАТА СРЕДА НА ELENDT M7 И M4

Аклиматизация към средите на Elendt M7 и M4

Някои лаборатории срещат трудности при директното прехвърляне на *Daphnia* към среди M4 (1) и M7. Обаче са постигнати някои успехи при постепенната аклиматизация, т.е. преместване от една среда от 30 % Elendt към 60 % Elendt и след това към 100 % Elendt. Може да се наложи периодите на аклиматизация да бъдат дълги по един месец.

ПОДГОТОВКА

Елементи с микроконцентрация

Първо във вода със съответната чистота, т.е. дейонизирана, дестилирана и обратна осмоза, се приготвят отделени основни разтвори (I) от индивидуални елементи с микроконцентрация. От тези различни основни разтвори (I) се приготвя втори отделен основен разтвор, който съдържа всички елементи с микроконцентрация (комбиниран разтвор), т.е.:

Основни разтвори I (единично вещество)	Количество, прибавено към водата (mg/l)	Концентрация (взависимост от средата M4) (на част)	За приготвяне на комбиниран основен разтвор II добавете следното количество основен разтвор I към водата (ml/l)	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000	1,0	0,25
$MnCl_2$ $4H_2O$	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$SrCl_2$ $6H_2O$	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na_2MoO_4 $2H_2O$	1 260	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2$ $2H_2O$	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2$ $6H_2O$	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
Na_2EDTA $2H_2O$	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4VH_2O$	1 991	2 000	—	—

И при разтвор на Na_2EDTA, и при разтвор на $FeSO_4$ разтворите се приготвят отделно, изливат се заедно и незабавно се автоклавират. Това дава:

2l разтвор на Fe-EDTA		1 000 на част	20,0	5,0

▼B

Среди M4 и M7

Средите M4 и M7 се приготвят чрез използване на основен разтвор II, макронутриенти и витамини, както следва:

	Количество, прибавено към водата (mg/l)	Концентрация (взависимост от средата M4) (на част)	Количество основен разтвор, прибавено към средата (ml/l)	
			M4	M7
Съчетани микроелементи основен разтвор II		20	50	50
Основен разтвор с макронутриенти (единично вещество)				
$CaCl_2$ $2H_2O$	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4$ $7H_2O$	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
Na_2SiO_3 $9H_2O$	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1
Комбиниран разтвор на витамини	—	10 000	0,1	0,1
Комбинираният разтвор на витамини се приготвя чрез прибавяне на 3 витамина към 1 l вода, както е показано по-долу:				
Тиамин хидрохлорид	750	10 000	—	—
Цианокобаламин (B_{12})	10	10 000	—	—
Биотин	7,5	10 000	—	—

Комбинираният разтвор на витамини се съхранява замразен на малки, съразмерни части. Малко преди употреба се добавят витамините към средата.

Бележки: За да се избегне утаяването на соли, когато се приготвя цялата среда, се прибавя съразмерна част от основния разтвор от около 500 — 800 ml дейонизирана вода и след това се допълва до 1 l.

Първото публикуване на среда M4 може да се намери при Elendt (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. 154, 25—33.

▼B

Приложение 2

АНАЛИЗ НА ОБЩИЯ ОРГАНИЧЕН ВЪГЛЕРОД (TOC) И СЪЗДАВАНЕ НА НОМОГРАМА ЗА TOC СЪДЪРЖАНИЕ НА ХРАНАТА ОТ МОРСКИ ВОДОРАСЛИ

Приема се, че съдържанието на въглерод в храната от морски водорасли обикновено не се измерва директно, а от корелациите (т.е. номограмите) със заместващи мерки, такива като броя на клетките морски водорасли или адсорбцияТА на светлина.

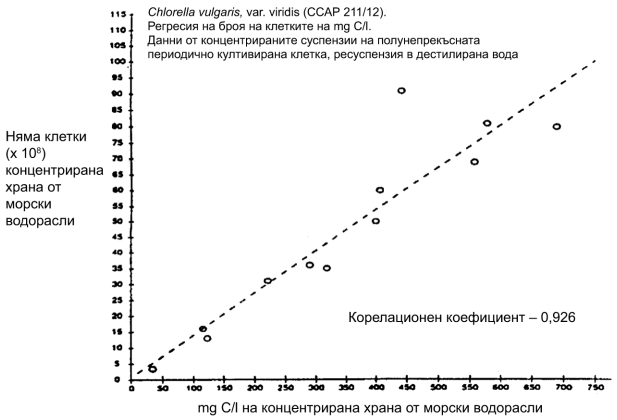
TOC се измерва по-скоро чрез високотемпературно окисляване, отколкото чрез UV или персулфатни методи (вж. Инструментално определяне на общия органичен въглерод, общия нужен кислород и съответните детерминанти 1979, The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

За създаване на номограмата водораслите следва да се отделят от средата на растеж чрез центрофуга, след което следва ресуспензия в дестилирана вода. Измерват се параметрите заместители и TOC концентрацияТА във всички проби по три екземпляра. Празните проби с дестилираната вода се анализират и TOC концентрацията се изважда от TOC концентрацията на пробите от морски водорасли.

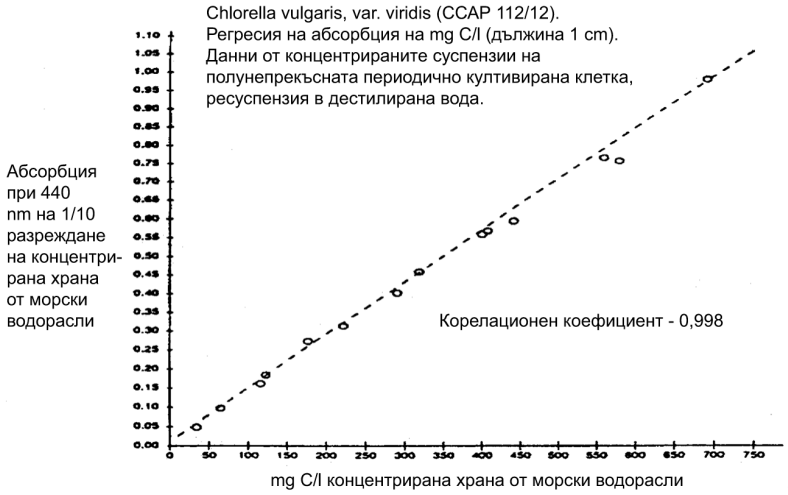
Номографията е линеарна при изисквания обхват на концентрацията от въглерод. Примерите са показани по-долу.

NB: Те следва да не се използват за конверсия; необходимо е лабораториите да приготвят техни собствени номограми.





▼B


Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 112/12).
Регресия на абсорбция на mg C/l (дължина 1 cm).
Данни от концентрираните суспензии на полунепрекъсната периодично култивирана клетка, ресуспензия в дестилирана вода.
Абсорбция при 440 nm на 1/10 разреждане на концентри-рана храна от морски водорасли
Корелационен коефициент - 0,998
mg C/l концентрирана храна от морски водорасли

▼B

Приложение 3

ПРИМЕРНА ТАБЛИЦА ЗА ЗАПИСВАНЕ ВЪЗСТАНОВЕНАТА СРЕДА, ДАННИ ОТ ФИЗИКОХИМИЧЕН МОНИТОРИНГ, ХРАНЕНЕ, РЕПРОДУКТИВНОСТ НА DAPHNIA И СМЪРТНОСТ ПРИ ВЪЗРАСТНИТЕ ИНДИВИДИ

Експеримент №:	Начална дата:			Клонинг:			Среда:				Вид храна				Тестващо вещество:				Номинална концентрация:					
Ден	О	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Възстановяване на средата (водна бълха)																								
PH ([1])																							нова	
																							стара	
O_2 mg/l ([1])																							нова	
																							стара	
температура (°C) ([1])																							нова	
																							стара	
Предоставена храна (водна бълха)																								
Няма живо поколение ([2])																								Общо
Съд 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

▼B

Експеримент №:	Начална дата:	Клонинг:	Среда:	Вид храна	Тестващо вещество:	Номинална концентрация:

Ден	О	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 при възрастните индивиди ([3])																								

([1]) Посочва се кой съд е използван за експеримента.
([2]) Записва се неразвитото поколение като „АВ“ в съответната клетка.
([3]) Записва се смъртността на всяко възрастно животно като „М“ в съответната клетка.

▼B

Приложение 4

ПРИМЕРНА ТАБЛИЦА ЗА ЗАПИСВАНЕ РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ХИМИЧНИЯАНАЛИЗ

а) **Измерени концентрации**

Номинална концентрация	Проба от I седмица		Проба от II седмица		Проба от III седмица	
	прясна среда	стара среда	прясна среда	стара среда	прясна среда	стара среда

б) **Измерени концентрации като процент от номинала**

Номинална концентрация	Проба от I седмица		Проба от II седмица		Проба от III седмица	
	прясна среда	стара среда	прясна среда	стара среда	прясна среда	стара среда

▼B

Приложение 5

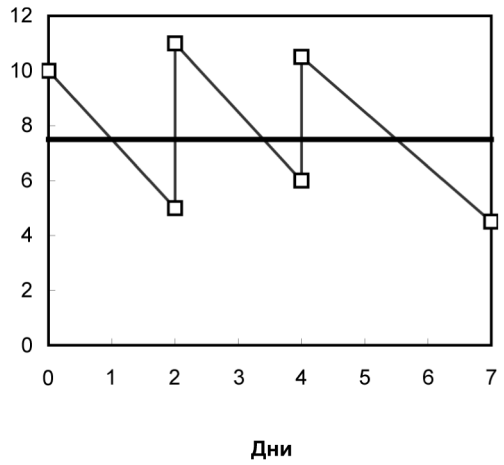
ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА НАТОВАРЕНА СРЕДНА СТОЙНОСТ

Натоварена средна стойност

Когато е дадено, че концентрацията тествано вещество може да се намали за периода между възстановяването на средата, е необходимо да се прецени коя концентрация от обхвата на изпробваните концентрации върху родител *Daphnia* да се избере като представителна. Изборът се основава на биологически и статистически преценки. Например ако репродуктивността е повлияна най-вече от изпробваната върхова концентрация, тогава се използва максималната концентрация. Обаче ако се смята, че акумулираните и по-дългосрочни въздействия на токсичното вещество са по-важни, то средната концентрация е по уместна. В този случай подходящата средна величина, която се използва, е концентрацията на натоварена средна стойност, тъй като се взима под внимание променливостта на моментната концентрация през времето.

Фигура 1

Пример за натоварена средна стойност



Фигура 1 показва пример за опростен тест, който продължава седем дни с възстановяване на средата в дни 0, 2 и 4.

Тънката зигзагообразна линия показва концентрацията по всяко време. Предполага се, че падането на концентрацията следва експоненциалния процес на разлагане.

Шестте изобразени точки представят наблюдаваните концентрации, които са измерени в началото и в края на всеки период на възстановяване.

Дебелата линия показва позицията на натоварената средна стойност.

Натоварена средна стойност се изчислява така, че зоната под натоварената средна стойност да е равна на зоната под кривата на концентрация. Изчисляването за по-горе посочения пример е посочено в таблица 1.

▼B

Таблица 1

Изчисляване на натоварената средна стойност

№ на възстановяване	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
Общ брой дни: 7					Обща площ	50,091
					Натоварена средна стойност	7,156

„Дни“ е броят на дните в периода на възстановяване.

„Конц0“ е измерената концентрация в началото на всеки период на възстановяване.

„Конц1“ е измерената концентрация в края на всеки период на възстановяване.

„Ln (Конц0)“ е естествен логаритъм на Конц0.

„Ln (Конц1)“ е естествен логаритъм на Конц1.

„Площ“ е площта под експоненциалната крива за всеки период на възстановяване. Изчислява се с уравнението:

$$Площ = \frac{Конц0 - Конц1}{Ln(Конц0) - Ln(Конц1)} \times Дни$$

Натоварената средна стойност и общата зона са разделени на общия брой дни.

Разбира се, за теста 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 периода на възстановяване, е невъзможно да се потвърди, че процесът на спадане е всъщност експотенциален. Различна крива би довела до различно изчисление за графата „Площ“. Обаче експоненциалният процес на разлагане не е неприемлив и вероятно е най-добрата крива, която при отсъствието на друга информация следва да се използва.

Изисква се обаче внимателно боравене, ако химическият анализ не доведе до намиране на някакво вещество в края на периода на възстановяване. Ако не е възможно да се оцени колко бързо веществото изчезва от разтвора, е невъзможно да се получи реалистична площ под кривата и следователно е невъзможно да се постигне разумна натоварена средна стойност.

▼B

B.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 ОИСР 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 EC_{50} 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 предполаганото 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

Пресятата 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 ± 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 ± 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:

— разбъркващо/клатачно устройство: механична клатачка или еквивалентно оборудване;

— центруфуга (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 %;

— pH: 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 биолигична ефективност (напр. калциев цианамид), трябва да бъде избягвано.

Вземането на проби се избягва през или веднага след дълги (подълги 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 (подобрена/захранена) с подходящ органичен субстрат, напр. люцерна-зелена трева (основен компонент: *Medicago sativa)* със съотношение C/N между 12/1 и 16/1. Препоръчваното 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 третират 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 предвижданите концентрации в околната среда (PEC) и пет времена за концентрация. Веществата, които се очаква да бъдат прилагани в почвата неколкократно за един сезон, трябва да бъдат изпитвани при концентрации, получени от умножението на PEC и очаквания максимален брой апликации. 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 EC_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 третираните 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, стойностите на образувания нитрат в третираните 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 третираните и контролните почвени проби и се изчисляват стойностите на EC_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 апликации), 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 EC_{50}, EC_{25} и/или EC_{10}.

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);

— pH (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);

— —микробиална 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;

— пялата 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

B.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 Belgirate, 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 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 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 метаболично активната микробна биомаса (7). Ако биомасата във въглеродно трансформираните 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 предполаганото 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

— pH: 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 замурсявания. 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 (подълги 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 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 третират 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 предвижданите концентрации в околната среда (PEC) и пет времена за концентрация. Веществата, които се очаква да бъдат прилагани в почвата неколкократно за един сезон, трябва да бъдат изпитвани при концентрации, получени от умножението на PEC и очаквания максимален брой апликации. 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 EC_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 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, 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 третираните 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 третираните 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 третираните и контролните почвени проби и се изчисляват стойностите на EC_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);

— pH (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 подпроби);

— 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) Heinemeye, r O., Insam, H., Kaiser, E. A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77—81.

(12) 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). Einfluu 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 Belgirate, 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 CO_2 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 (примеси). 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 $^{14}CO_2$ (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, ^{3}H, ^{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 n-октанол/вода (метод А.8);

д) химична стабилност на тъмно (хидролиза) (метод В.7);

е) pK_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 $^{14}CO_2$ 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 повторяемостта 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 $mg.kg^{-1}$ 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;

— центруфуга;

— 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);

— H_2SO_4, аналитически чиста за анализ, 0,05 $mol.dm_{-3}$;

— 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 pH = 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, pH, 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 pF 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 фотолиза (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 овлажнен 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 микробиален 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 pF обхвата от 2,0 до 2,5. Характерните стойности на влажността на различните видове почви са посочени в приложение 2.

▼B

1.9.1.5. *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 DT_{50} (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 pH, 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. pH, 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 (степента 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 са 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 % CO_2.

▼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 партиди 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 третираната 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 нетретираните 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:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha]\cdot 10^{6}[mg/kg]}{1[m]\cdot 10^{4}[m^{2}/ha]\cdot d\left[kg_{soil}/m^{3}\right]}$$

C_{soil} = начална концентрация в почвата[$mg.kg^{-1}$]

A = апликационно ниво [$kg.ha^{-1}$]; 1 = дебелина на почвения слой на полето [m]; d = насипна плътност на суха почва [$kg.m^{3}$].

Практическо правило за получаване на резултати е прилагане на апликационно ниво от 1 $kg.ha^{-1}$ при концентрации в почвата приблизително 1 $mg.kg^{-1}$ в 10 cm слой (приема се насипна плътност от 1 $g.cm^{3}$).

▼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 анализиране 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 анализиране.

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 неекстрахираните 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 ≥ 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 pH, 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;

— pH, 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 fer die amtliche Prъfung 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 трансformation 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 трансformations. 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. Kelney, 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) Мъckenhausen, 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 трансformation in the environment: Aerobic and biотрансformation 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., Sjцdahl-Svensson K., Stenstrцm 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.

▼B

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
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Точка на сушене
10^4	4	10	
10^3	3	1	
6.10^2	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	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	Водоросявана почва

([a]) pF = log на cm воден стълб.
([b]) 1 bar = 10^5 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 капилярен 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.

▼B

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.

▼B

Приложение 3

Фигура 1

Пример за проточна апаратура за изследване на трансформацията на химикали в почва ([1]) ([2])

1: игленвентил

2: газопромиваща бутилка, съдържаща вода

3: ултрамембрана (само при стерилни условия), с размер на порите 0,2 μm

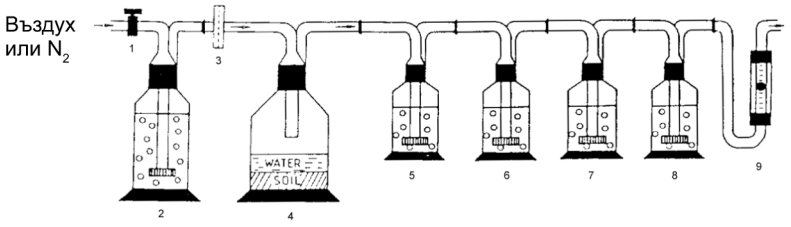
4: колба за почвения метаболизъм (само при анаеробни и условия при наводняване;)

5: етилен гликол за улавяне на органични летливи съединения

6: сярна киселина за улавяне на алкални летливи съединения

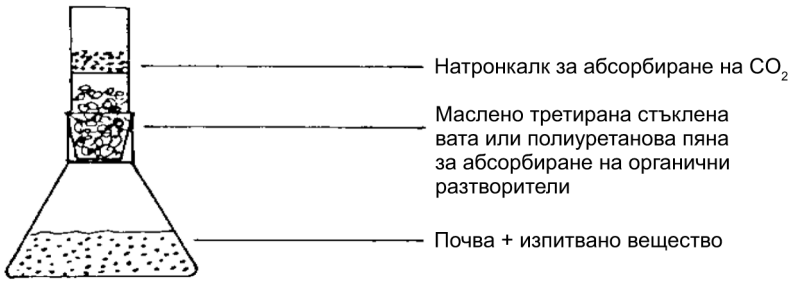
7, 8: натриев хидроксид за улавяне на CO_2и други киселинни летливи съединения

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

B.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 ОИСР 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 CO_2 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 $^{14}CO_2$ или съответно $^{14}CH_4$.

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.

DT_{50} (време на изчезване 50): е времето, за което началната концентрация на изпитваното вещество намалява с 50 %;

DT_{75} (време на изчезване 75): е времето, за което началната концентрация на изпитваното вещество намалява със 75 %.

DT_{90} (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, ^{3}H, ^{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 n-октанол/вода (метод A.8);

д) адсорбционен коефициент (K_d, K_f или K_{oc}, където е възможно) (метод B.18);

е) хидролиза (метод B.7);

ж) дисоциационна константа (pK_a) [Насоки на ОИСР 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 с ^{14}C),

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 слаболетливи, нелетливи, водоразтворими или слаборазтворими 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 до 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 повторяемостта 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. **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 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 $mg.kg^{-1}$ 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 полуразпада (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 CO_2 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 компенсира 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 CO_2, чрез преминаване на газа през кварцова тръба, напълнена с CuO при температура 900 °C и улавяне на образувания CO_2 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), масспектрометрия (MS), газ-хроматография-масспектрометрия (GC-MS), течна хроматография-масспектрометрия (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 вентилиралия 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.

▼B

1.8.2. **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 (намеси) 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 pH обхватът на седиментите е важен за изпитвани химикали, за които трансформацията и/или сорбцията могат да бъдат зависими от pH. Върху pH 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, биоанално (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.

▼B

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
TOC			X	X		X
Концентрация на 0_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				
TOC		X	X	X		X
Микробна биомаса (*)		X		X		X
Редоксипотенциал (**)	Наблюдения (цвят/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 Проекторъководството 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 позоваванията (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 pH, 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 (± 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 прилагате 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 третирани 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 изпитващото вещество, може да бъде счетено 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 ≥ 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 бъда 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 ^{14}C-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 biотрансformation 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 трансformation 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: Fumigationextraction 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. Chemoshpere 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.

▼B

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

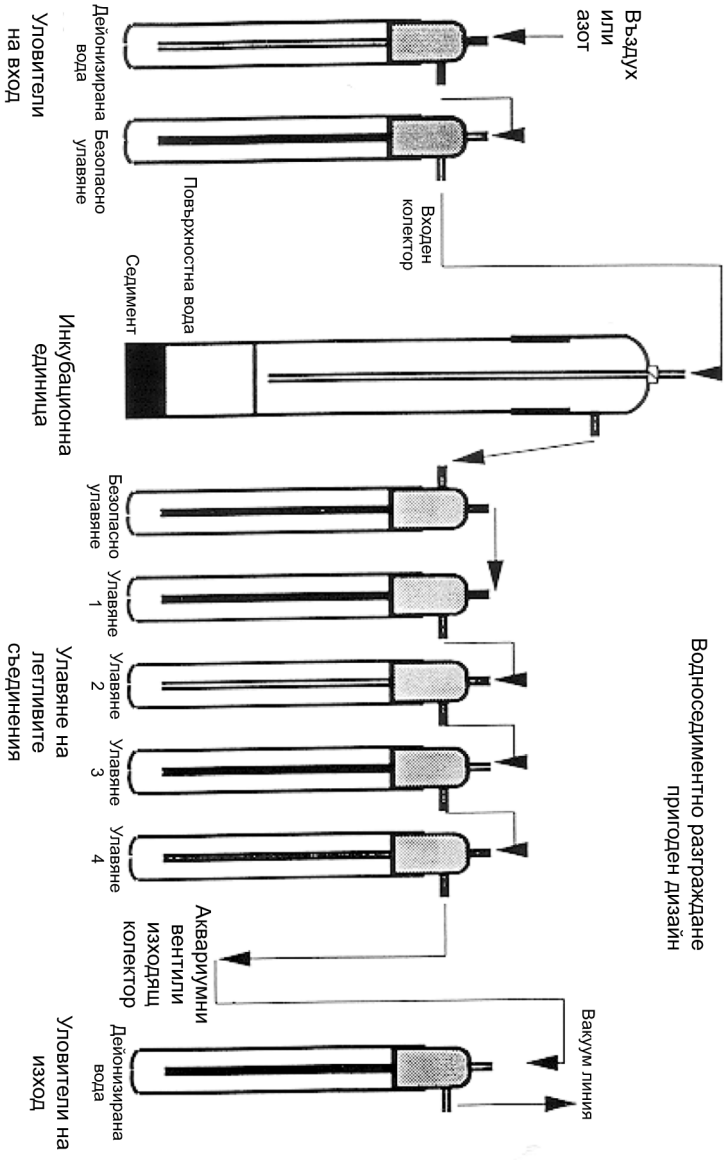
При анаеробната система за изпитване процедурата за изпитване основно е същата както тази, изложена за аеробната система за изпитване, с изключение на това, че над повърхността на водата във всяка инкубационна единица преминава влажен азот, за да се поддържа достатъчно количество азот в горното пространство. 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.

▼B

Приложение 2

ПРИМЕР ЗА ГАЗОПРОТОЧНА АПАРАТУРА

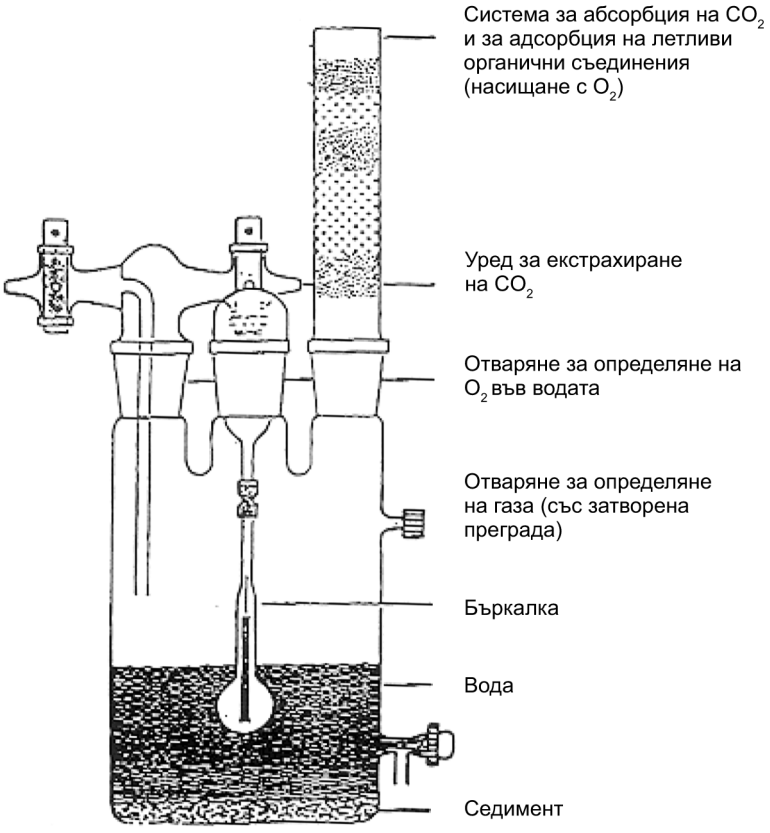


Безопасно улавяне - празен уловител
Улавяне 1:
етилен гликол за улавяне на органични летливи съединения
Улавяне 2:
сярна киселина 0,1M за улавяне на алкални летливи съединения
Улавяне 3:
натриев хидроксид 2M за улавяне на въглероден диоксид и други летливи съединения

▼B

Приложение 3

ПРИМЕР ЗА БИОМЕТРИЧНА АПАРАТУРА



▼B

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

B.25. **АЕРОБНА МИНЕРАЛИЗАЦИЯ В ПОВЪРХНОСТНИ ВОДИ — СИМУЛАЦИОННО ИЗПИТВАНЕ ЗА БИОРАЗГРАЖДАНЕ**

1. **МЕТОД**

Този метод е еквивалентен на ОИСР 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 симулационно 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 C.23 и C.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 симулационното 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 микробиалния 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 разлагащите 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 способа 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 микробиалната 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. Представлява 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. Представлява 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): Онази част от органичния въглерод във водна проба, която не може да бъде отделена чрез определеното фазово разделяне, например чрез центрофугиране при 40 000 ms^{-2} в продължение на 15 минути или чрез мембранно филтриране, използвайки мембрани с отвори с диаметър 0,2 μm — 0,45 μm.

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 $Pa \cdot m^3/mol$ (приблиз. 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) 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 $Pa \cdot m^3/mol$ или < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) 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 $^{14}CO_2$; 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 разклащане. 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 ^{14}C. 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 ^{14}C, или остатъчната концентрация на изпитваното вещество, при използването на специфичен химичен анализ. Маркирането на най-стабилната част от молекулата с ^{14}C осигурява определянето на общата минерализация, докато маркирането с ^{14}C 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, биоакумулиране и др.). В такъв случай по-подходящо би било използването на маркирано с ^{14}C изпитвано вещество във функционалната му част с цел да се проследи елиминирането на специфичното свойство.

1.5. ИНФОРМАЦИЯ ЗА ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

За това изпитване могат да бъдат използвани както радиомаркирани, така и немаркирани изпитвани вещества. Препоръчва се методът за маркировка с ^{14}C, 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 ^{14}C. В допълнение към това, за предпочитане е един или повече въглеродни атома от двете страни на лесно разпадащи се връзки да са маркирани с ^{14}C. 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 ^{14}C 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 [ОИСР 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, ОИСР 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 повторяемостта 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 целеви 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. **Повторяемост и чувствителност на аналитичния метод**

Повторяемостта на аналитичния метод (включително и ефикасността 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 непропускащи 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 газонепропускащи 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;

— pH-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 pH 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: извлечете 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. **Полунепрекъсната 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 инициирано 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 полунепрекъснато, ако в рамките на приблизително 60 дни на изпитване чрез сериен 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 mg/L) и ниска летливост (с константи по закона на Хенри < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ или < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) 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 полунепрекъсната 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 $^{14}CO_2$ (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 pH 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 метаболизмът 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 пелагични 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 μg/L и за предпочитане е да бъдат в диапазона < 1—10 μg/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 репликата 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 изберат 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).

▼M1

1.8.9.2. *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 μg/l) (обозначение F_C). Целта на референтния контрол е да се потвърди минимална микробиална 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 веществото (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 изследователят трябва да вземе под внимание относителната важност на увеличената репликатност 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 $^{14}CO_2$ се измерва директно и индиректно (вж. допълнение 3). $^{14}CO_2$ 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 pH 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 $^{14}CO_2$ 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 $^{14}CO_2$ 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 $^{14}CO_2$ се измерва директно по време на изпитването, трябва да си осигурите повече колби за тази цел в началото на изпитването. Директното измерване на $^{14}CO_2$ 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 pH 2—3 и $^{14}CO_2$ се събира във вътрешен 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 $^{14}CO_2$, 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 ≥ 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 $t_{½} = ln2/k$ 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, установете 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 $^{14}CO_2$, 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 $^{14}CO_2$. Вграденият в продукти от биосинтеза ^{14}C впоследствие бавно се отделя под формата на $^{14}CO_2$ 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 $^{14}CO_2$ спрямо времето ще покаже „снижаване“ 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 по-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 индиректно определяне на $^{14}CO_2$ (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 ≥ 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 микробиалната 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 ± 0,4 d^{-1} ($t_{½}$ = 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 радио-маркираните 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 целеви 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 pH 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 заустявания в близките околности и видове заустявания, 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 песъчливи);

— текстура (напр. процент едър пясък, фин пясък, тиня и глина)

— сухо тегло на суспендираните неразтворени вещества в g/l, концентрация на TOC или загуба на тегло при горене като показател за измерване на съдържанието на органично вещество;

— pH

— 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);

— повторяемост 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. ОИСР (1993). Насоки за изпитването на химикали. ОИСР, 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. ОИСР 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 (TOA) трябва да бъдат допълнени с измервания на тегловния баланс, включващи директно определяне на отделения $^{14}CO_2$ след улавянето му в абсорбер (вж. допълнение 3). Само по себе си, действителното получаване на $^{14}CO_2$ 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 TOA 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 микробиална 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. Образуването 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 течно сцинтилационно броене.

▼M1

Допълнение 2

Полунепрекъсната 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 полунепрекъсната 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 сериен метод не е постигнато никакво разграждане на изпитваното вещество. Когато бъде отчетена значителна степен на разграждане (напр. > 20 %), полунепрекъсната процедура може да бъде преустановена и изпитването да продължи като сериен 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 полунепрекъсната 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 полунепрекъсната 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 x K_{ow}

Коефициент на разпределение, K_d = f_C x K_{oc},

след което разтворената част от общата концентрация (С-вода (C_w)/С-общо (C_t) е:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 103 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Допълнение 3

Определяне на $^{14}CO_2$

Индиректно определяне на $^{14}CO_2$

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 течно 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 $^{14}CO_2$ 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 (POA) 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 изгниване на пробата в продължение на една нощ с помощта на тъканен солюбилизатор и след това се извърши хомогенизиране чрез вихров миксер преди добавянето на сцинтилационна течност. Алтернативно, POA 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.

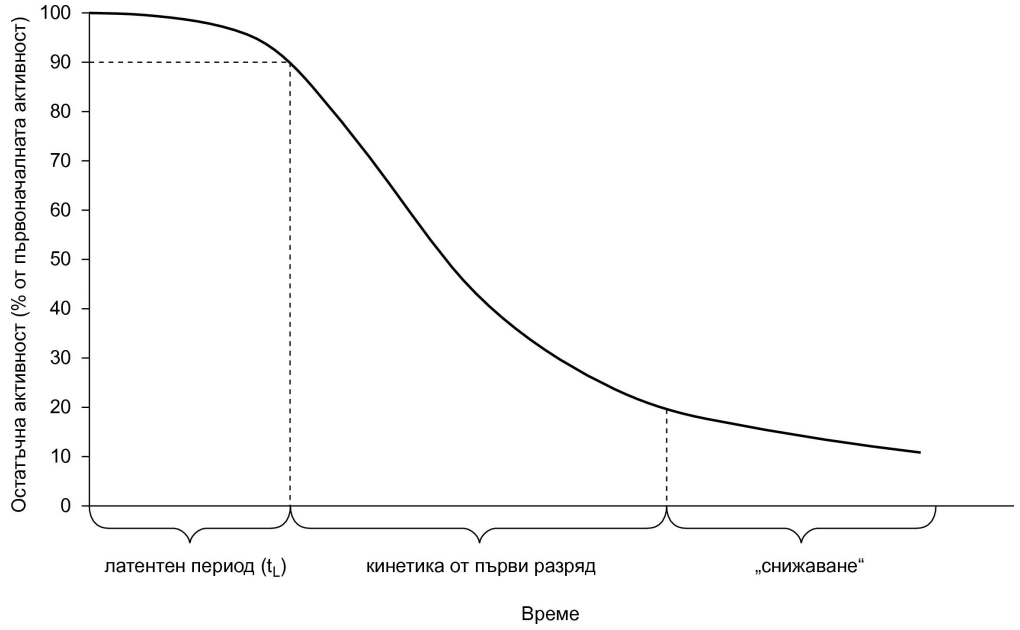
Директно определяне на $^{14}CO_2$

Ако отделеният $^{14}CO_2$ 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 $^{14}CO_2$ 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 $^{14}CO_2$ колбите трябва да бъдат затворени, например с прегради от бутилов каучук.

▼**M1**

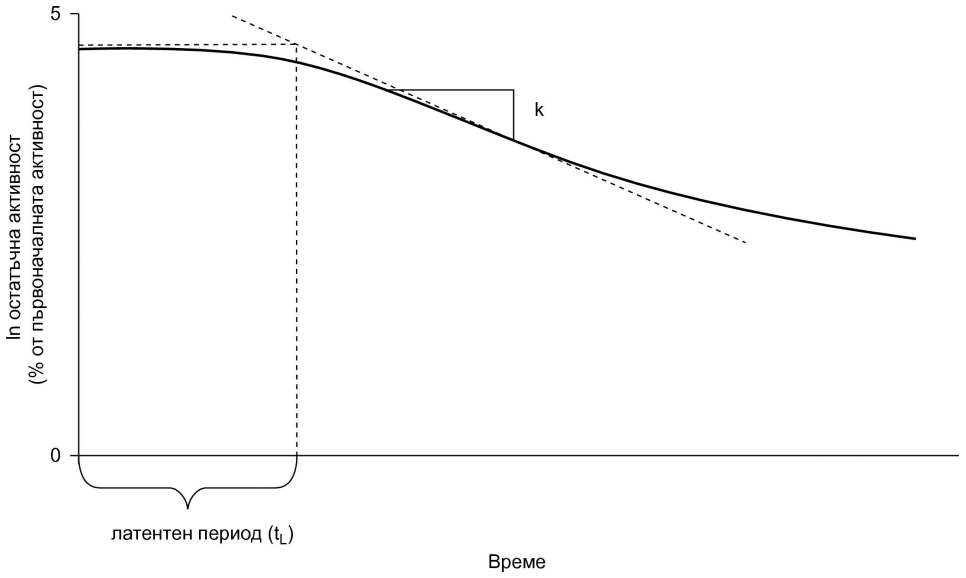
Фигура 1а

Пример за аритметично графично изобразяване (остатъчна активност спрямо времето)



Фигура 1б

Пример за полулогаритмично графично изобразяване (ln остатъчна активност спрямо времето)



▼M1

B.26. ИЗПИТВАНЕ ПОТИСКАНЕТО НА РАСТЕЖА НА ВИДА *LEMNA*

1. МЕТОД

Настоящият метод е еквивалентен на ОИСР TG 221 (2006) (1). Съществува широко съгласие между институциите на ЕС, че изпитването Lemna е подходяща алтернатива на изпитването с водорасли за силно оцветени вещества (2)(3).

1.1. ВЪВЕДЕНИЕ

Настоящият метод за изпитване е предназначен за оценяване на токсичността на вещества по отношение на сладководни растения от вида *Lemna* (водна леща). Той се базира на съществуващите насоки (4)(5)(6)(7)(8)(9), но включва и модификации на тези методи с цел да бъдат отразени най-скорошните научни изследвания и обсъждането на редица ключови въпроси. Предложеният метод е валидиран чрез международно кръгово изпитване (10).

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 вида *Lemna* 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 клонинг, 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 поетапни стъпки за поддържане на минимално замърсяване с други организми.

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 вещества, които бързо се губят от разтвора в резултат на изпаряване, фоторазграждане, утаяване или биоразграждане. Допълнителни насоки са дадени в (11).

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

За целите на настоящия метод на изпитване са използвани следните определения и съкращения:

Биомаса: сухото тегло на живите организми, съдържащи се в една популация. В настоящото изпитване заместителите на биомасата, като количеството листовидни тела или площта на листовидните тела обикновено са измерени и поради това използването на термина „биомаса“ се отнася също и за измерванията на заместителите.

Хлороза: пожълтяване на тъканта на листовидните тела.

Клонинг: организъм или клетка, възникнал от единствен индивид чрез безполово възпроизвеждане. Следователно, индивидите от един и същи клонинг са генетично идентични.

Колония: означава съвкупност от майчини и дъщерни листовидни тела (обикновено от 2 до 4), закрепени един към друг. Понякога се посочва като растение.

▼M1

EC_x: концентрацията на изпитваното вещество, разтворено в средата на изпитване, която води до потискане на растежа от x % (например 50 %) на Lemna в рамките на определения период на експозиция (да бъде изрично отбелязано, ако има отклонение 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_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: изпитване, при което изпитваните разтвори се подменят постоянно.

Листовидно тяло: отделна/единична „листообразна“ структура на растението водна леща. Това е най-малката единица, т.е. годен за възпроизводство индивид.

Издутост: означава листовидни тела, чийто външен вид е изпъкнал или набъбнал.

Растеж: нарастване на измерваната променлива, например на броя на листовидните тела, сухото тегло, мокрото тегло или площта на листовидните тела през периода на изпитване.

Скорост на растеж (средна специфична скорост на растеж): логаритмичното нарастване на биомасата през периода на експозиция.

Най-ниска концентрация на наблюдавано въздействие (LOEC): най-ниската изпитвана концентрация, при която за веществото се наблюдава статистически значимо понижаващо въздействие върху 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: всички видове променливи, които се измерват с цел да се изрази крайната точка на изпитването с помощта на една или няколко различни променливи на реакцията. При настоящия метод измерваните променливи са броят на листовидните тела, площта на листовидните тела, свежото тегло и сухото тегло.

Монокултура: култура от един вид растение.

Некроза: мъртва (т.е. бледа или просмукана с вода) листна тъкан.

Концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC): изпитваната концентрация, непосредствено под LOEC.

Фенотип: наблюдаемите характеристики на един организъм, определени от взаимодействието на неговите гени и неговата околна среда.

Променливи на реакцията: променливите за оценяване на токсичността, изведени от произволни измервани променливи, описващи биомасата, с помощта на различни методи за изчисление. При настоящия метод, скоростите на растежа и на добива са променливи на реакцията, изведени от измервани променливи като брой листовидни тела, площ на листовидните тела, свежо тегло или сухо тегло.

Полустатично (обновяемо) изпитване: изпитване, при което изпитваният разтвор периодично се подменя на определени интервали по време на изпитването.

Статично изпитване: метод за изпитване без обновяване на изпитвания разтвор по време на изпитването.

▼**M1**

Крайна точка на изпитване: описва общия показател, който ще бъде изменен от химикала за изпитване по отношение на контролната проба като цел на изпитването. При настоящия метод крайната точка на изпитването е потискането на растежа, което може да се изрази чрез различни променливи на реакцията на базата на една или повече измервани променливи.

Среда на изпитване: напълно синтетичната среда на растеж, върху която растат изпитваните растения, когато са подложени на въздействието на веществото за изпитване. Веществото за изпитване обикновено се разтваря в средата на изпитване.

Добив: стойността на измервана променлива, чрез която се изразява биомасата в края на периода на експозиция минус измерваната променлива в началото на периода на експозиция.

1.3. ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

Дадена е възможност експоненциално растящите растителни култури от вида *Lemna* да растат като монокултури при различни концентрации на изпитваното вещество за период от седем дни. Целта на изпитването е да се измерят количествено свързаните с веществото 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 вещества могат да окажат много по-голямо въздействие върху други измервани променливи, отколкото върху броя на листовидните тела. За количествена оценка на свързани с веществата въздействия, растежът в изпитваните разтвори се сравнява с този на контролните проби и се определят концентрациите, при които се осъществява потискане на растежа до определените x % (например 50 %) и се изразяват като EC_x (например EC_{50})

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 се изразява като E_rC_x (например E_rC_{50}).

Допълнителната променлива на растеж, 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 (например E_yC_{50}).

В допълнение концентрацията с най-ниско наблюдавано въздействие (LOEC) и концентрацията с ненаблюдавано въздействие (NOEC) могат да бъдат определени статистически.

1.4. ИНФОРМАЦИЯ ОТНОСНО ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

Следва да е възможно използването на аналитичен метод с достатъчна чувствителност за количествено измерване на веществото в средата на изпитване.

▼M1

Информацията относно изпитваното вещество, 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 са възможни значителни загуби на изпитваното вещество 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 изпитваното вещество 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.

Когато контролът върху pH на средата на изпитването е особено важен, например при изпитване на метали или вещества, които са нестабилни при хидролизата, се препоръчва добавянето на буферно вещество към хранителната среда (вж. първата алинея от раздел 1.7.4). Допълнителни насоки относно изпитвани вещества, чиито физикохимични свойства затрудняват тяхното изпитване, са дадени в (11).

1.5. РЕФЕРЕНТНО ВЕЩЕСТВО

Референтното вещество (референтните вещества), като например 3,5-дихлорфенол, използвано в международното кръгово изпитване (10), може да бъде изпитвано като средство за проверка на процедурата за изпитване. Желателно е референтното вещество да се изпитва най-малко два пъти годишно или, когато изпитването се извършва по-рядко, да се извършва едновременно с определянето на токсичността на изпитваното вещество.

1.6. ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

За да е валидно изпитването, времето за удвояване на листовидното тяло 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 (8). Очаква се също, че този критерий е достижим и в условия на полустатично и проточно изпитване. Изчисляването на времето за удвояване е показано в раздел 2.1.

1.7. ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

1.7.1. **Апаратура**

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 съда за изпитването не е от решаващо значение, при условие че тези изисквания са изпълнени. Доказано е, че подходящи за целта са стъклени лабораторни чаши, блюда кристализатори или стъклени блюда на Петри с нужните размери. Съдовете за изпитването трябва да бъдат покрити с оглед минимизиране на изпарението и на 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.

▼M1

Културите и съдовете за изпитването трябва да не се съхраняват заедно. Това се постига най-добре с използването на изолирани от въздействията на околната среда, камери, инкубатори или помещения за растеж. Необходимо е осветлението и температурата да могат да се контролират и да се поддържат на постоянно ниво (вж. раздел 1.7.8).

1.7.2. **Изпитван организъм**

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 1. Растителният материал може да бъде получен от колекция от култури, от друга лаборатория или от полето. Ако са събрани от полето, 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 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 клонинга (ако е известен), използвани в изпитването, трябва винаги да се докладва.

Трябва да бъдат използвани монокултури, които нямат видимо замърсяване с други организми като водорасли и протозоа. Здравите растения от *L. minor* трябва да се състоят от колонии, включващи между два и пет листовидни тела, докато здравите колонии на *L. gibba* могат да съдържат до седем листовидни тела.

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 и обезцветяване (хлороза). Признак за култури с добро качество е големият обхват на колонии, съставени от поне две листовидни тела. Голям брой отделни листовидни тела е показателен за екологичен стрес, например ограничаване на хранителните вещества, като растителен материал от такива култури не трябва да се използва за изпитване.

1.7.3. **Култивиране**

За намаляване на честотата за поддръжка на културата (например когато не са планирани изпитвания с *Lemna* за известен период), културите трябва да се съхраняват при намалено осветление и температура (4—10 °C). Подробности за култивирането са дадени в допълнение 2. Очевидни знаци за замърсяване с водорасли или други организми изискват стерилизация на повърхността на подпроба от листообразните тела на *Lemna*, последвана от прехвърляне в прясна среда (вж. допълнение 2). В такъв случай останалата замърсена култура трябва да се изхвърли.

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.

1.7.4. **Среда на изпитване**

Препоръчват се различни среди за *Lemna minor* и за *Lemna gibba*, както е описано по-долу. Трябва внимателно да се прецени включването на pH буфер в средата на изпитване (MOPS (4-морфолинпропанова сулфонна киселина, № по CAS: 1132—61—2; № по EINECS: 214—478—5) в средата за *L. minor* и $NaHCO_3$ в средата за *L. gibba*), когато има предположения, че буферът може да реагира с изпитваното вещество и да повлияе на изразяването на неговата токсичност. Средата на Steinberg (12) също е приемлива, при условие че критериите за валидност са изпълнени.

▼M1

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 3.

Средата на растеж 20X — AAP, както е описана в допълнение 3, се препоръчва за култивиране и изпитване с *L. gibba*.

Средата на Steinberg, както е описана в допълнение 3, също е подходяща за *L. minor*, но би могла да се използва и за *L. gibba*, при условие че са изпълнени критериите за валидност.

1.7.5. **Разтвори за изпитване**

Разтворите за изпитване обикновено се приготвят чрез разреждане на изходните разтвори. Изходният разтвор на изпитваното вещество обикновено се приготвя чрез разтваряне на веществото в среда на растеж.

Най-високата изпитвана концентрация на изпитваното вещество обикновено не трябва да надвишава разтворимостта във вода на веществото при условията за провеждане на изпитването. Следва да се отбележи обаче, че видът *Lemna* плава на повърхността и може да бъде изложен на въздействието на вещества, които се събират на границата между водата и въздуха (например, слабо разтворими във вода или хидрофобни вещества или повърхностно активни вещества). При такива обстоятелства експозицията ще произтича от материал, различен от този в разтвора, и изпитваните концентрации могат, в зависимост от характеристиките на изпитваното вещество, да надвишат разтворимостта във вода. За изпитвани вещества с ниска водоразтворимост може да е необходимо да се приготви концентриран изходен разтвор или емулсия на веществото, като се използва органичен разтворител или дисперсант, за да се улесни добавянето на точни количества от изпитваното вещество 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 дисперсанти. Например обичайно използваните разтворители, които не предизвикват фитотоксичност при концентрации до 100 $\mu l \cdot l^{-1}$, включват ацетон и диметил формамид. Ако се използва разтворител или дисперсант, трябва да бъде отчетена неговата крайна концентрация и тя да се поддържа на минимално ниво ($\leq$ 100 $\mu l \cdot l^{-1}$), а всички третирани и контролни проби трябва да съдържат еднаква концентрация на разтворителя или дисперсанта. Допълнителни насоки относно използването на дисперсанти са дадени в (11).

1.7.6. **Изпитвана и контролна групи**

Предварителното познаване на токсичността на изпитваното вещество по отношение на *Lemna*, например от изпитване за определяне на диапазон, 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 коефициентът на разделяне между изпитваните концентрации да не надхвърля 3,2, но могат да се използват и по-големи стойности, при които кривата „концентрация—реакция“ е полегата. Трябва да се представи обосновка, ако са използвани по-малко от пет концентрации. Най-малко три идентични проби трябва да се използват за всяка от изпитваните концентрации.

При задаването на диапазона на изпитваните концентрации (за изпитване за определяне на диапазон и/или за окончателно изпитване за токсичност), трябва да се има пред вид следното:

▼M1

— за определяне на EC_x изпитваните концентрации трябва да обхващат стойността на EC_x, за да се гарантира подходящо доверително ниво. 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, присъединените доверителни интервали ще бъдат големи и правилната оценка за статистическото съответствие 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 от този в контролната проба. Ако това не е така, изпитването ще трябва да се повтори с използване на различен диапазон за концентрациите (освен ако най-високата концентрация е на границата на разтворимостта или максимално изискваната пределна концентрация, например 100 $mg \cdot l^{-1}$).

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 изпитваното вещество. Ако се използва спомагателен разтвор или дисперсант, трябва да бъде включена допълнително контролна третирана проба, като разтворителят/дисперсантът трябва да присъстват в същата концентрация като тази в съдовете с изпитваното вещество. 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.

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 повторните проби за всяка от концентрациите. Но все пак броят на повторните контролни проби трябва да е най-малко три.

1.7.7. **Експозиция**

Колониите, състоящи се от 2 до 4 видими листовидни тела, се прехвърлят от инокулираната култура и се прехвърлят на принципа на случайността 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 колонии трябва да е еднакъв във всеки съд за изпитване. Придобитият опит за настоящия метод и данните от кръговото изпитване показват, че използването на три повторни проби от една третирана проба, като всяка повторна проба съдържа в началото от 9 до 12 листовидни тела, е достатъчно за откриването на различията в растежа приблизително от 4 до 7 % на потискането, изчислено чрез скоростта на растежа (10 до15 %, изчислени чрез добива) между третираните проби (10).

За минимизиране 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 (или при по-честа промяна на разполагането) също се изискват блокова схема или промяна на разполагането чрез случаен подбор.

▼M1

Ако предварителното изпитване за стабилност показва, че концентрацията на изпитваното вещество не може да бъде поддържана (т.е. измерената концентрация пада под 80 % от първоначално измерената концентрация) по време 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 изпитваното вещество; 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 (11)(13).

Сценарият на експозиция чрез листно подхранване на растенията (пръскане) не е включен в настоящия метод за изпитване, вместо това вж. (14).

1.7.8. **Инкубационни условия**

Трябва постоянно да се използва топло или студено бяло флуоресцентно осветление, за да се осигури интензитет на светлината, избрана в диапазона 85—135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, когато се измерва във фотосинтетично активно излъчване (400—700 nm) в точки, чието разстояние от източника на светлина е еднакво с това на листовидни тела на *Lemna* (еквивалентно на 6 500—10 000 lux). Разликите в интензитета на светлината и избрания за площта на изпитването интензитет на светлината не трябва да нахвърлят ± 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 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-прецизни показания за описания тук вид многоточков източник на светлина.

Температурата в съдовете за изпитване трябва да бъде 24 ± 2 °C. Стойността на pH 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 pH в някои специални случаи, например когато се изпитват нестабилни вещества или метали. Вж. (11) за допълнителни насоки.

1.7.9. **Продължителност**

Изпитването се прекратява 7 дни след прехвърлянето на растенията в съдовете за изпитване.

1.7.10. **Измервания и аналитични определения**

В началото на изпитването се преброяват и записват листовидните тела в съдовете за изпитване, като се внимава да бъде гарантирано отчитането на подаващите се, ясно видими листовидни тела. Броят на листовидните тела, които изглеждат нормални или анормални, следва да се определи в началото на изпитването и 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 набъбналост, разпадане на колонията или загуба на способността за задържане върху повърхността на водата, както и 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).

▼M1

В допълнение към определянето на броя на листовидните тела по време на изпитването, трябва да се оценят и въздействията на изпитваното вещество върху една (или повече) от следните измервани променливи:

i) обща площ на листовидните тела,

ii) сухо тегло,

iii) свежо тегло.

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 инокулативната култура, която е образец 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. Ако не се измерва площта на листовидните тела, за предпочитане е сухото пред свежото тегло.

Общата площ на листовидните тела, сухото тегло и свежото тегло могат да бъдат определени, както следва:

i) *Обща площ на листовидните тела*: Общата площ на листовидните тела на всички колонии може да се определи чрез анализ на изображенията. Силуетът 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 на 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 колониите и да се определи тяхната площ с помощта на анализатор на площта на листата или с милиметрова хартия. И други техники (например съотношението по тегло на хартията между площта на силуета на колониите и единицата площ) може също да са подходящи.

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 също да се включат. Сухото тегло трябва да бъде изразено с точност най-малко 0,1 mg.

iii) *Свежо тегло*: Всички колонии се прехвърлят в тръби от предварително претеглен полистирол (или друг инертен материал) с малки (1 mm) дупки в заобления долни части. След това тръбите се центрофугират с 3 000 rpm в течение на 10 минути при стайна температура. Тръбите, които сега съдържат изсушените колонии, се измерват отново и свежото тегло се пресмята чрез изваждането на теглото на празната тръба.

1.7.10.1. *Честота на измерванията и аналитичните определения*

Ако се използва схема за статично изпитване, pH на всяка третирана проба трябва да се измери в началото и в края на изпитването. Ако се използва схема за полустатично изпитване, pH трябва да се измерва във всяка партида от „свеж“ разтвор за изпитване преди всяко подновяване, както и в съответните „изчерпани“ разтвори.

▼M1

Интензитетът на светлината трябва 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 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 във вегетационната камера, инкубатора или помещението, трябва да се записва най-малко веднъж дневно.

По време на изпитването концентрациите на изпитваното вещество се определят през подходящи интервали. При статични изпитвания минималното изискване е концентрациите да се определят в началото и края на изпитването.

При полустатични изпитвания, при които концентрацията на изпитваното вещество не се очаква да остане в рамките на ± 20 % от номиналната концентрация, е необходимо да се анализират всички прясно приготвени изпитвани разтвори и същите разтвори при всяко обновяване (вж. третата алинея от раздел 1.7.7). Обаче при тези изпитвания, при които измерената начална концентрация на изпитваното вещество не е в рамките на ± 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 определения могат да се извършат само за най-високата и най-ниската изпитвана концентрация. Във всички случаи определянето на концентрациите на изпитваното вещество преди обновяването е необходимо да се извършва само за един повторен съд за всяка изпитвана концентрация (или съдържанието на съдовете, обединени в пул от повторени проби).

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 разреждащото и изпитваното вещество или изходният разтвор на изпитваното вещество трябва да се проверяват ежедневно.

Ако има доказателство, че концентрацията на веществото, което се изпитва, се поддържа задоволително в рамките на ± 20 % от номиналната или измерената начална концентрация през цялото време на изпитването, анализът на резултатите може да се базира на номиналните или измерените начални стойности. Ако отклонението от номиналната или измерената начална концентрация е по-голямо от ± 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 изпитваното вещество (11).

1.7.11. **Гранично изпитване**

При някои обстоятелства, например когато едно предварително изпитване е показало, че изпитваното вещество няма токсично въздействие при концентрации до 100 $mg \cdot l^{-1}$, или до неговата граница на разтворимост в средата на изпитване (която от двете стойности е по-ниска), може да се предприеме гранично изпитване, включващо сравнение на реакциите в контролна група и една група с третирани проби (100 $mg \cdot l^{-1}$ 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 Student.

▼M1

2. **ДАННИ И ОТЧИТАНЕ**

2.1. ВРЕМЕ НА УДВОЯВАНЕ

За определяне на времето за удвояване (T_d) на броя на листовидните тела и придържането към този критерий за валидност при изследването (раздел 1.6) 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 първа и втора алинея от раздел 2.2.1.

2.2. ПРОМЕНЛИВИ НА РЕАКЦИЯТА

Целта на изпитването е да се определят въздействията на изпитваното вещество върху вегетативния растеж на *Lemna*. Настоящият метод за изпитване описва две променливи на реакцията, тъй като държавите-членки 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 променливи а) и б) на реакцията, описани по-долу.

а) Средна специфична скорост на растеж: тази променлива на реакцията 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 третирани проби. Понякога тя се нарича относителна скорост на растеж (15).

б) Добив: тази променлива на реакцията 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 третирани проби до края на изпитването.

Следва да се отбележи, че стойностите на токсичността, изчислени с помощта на тези две променливи на реакцията, 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_rC_x), по правило ще бъдат по-високи от резултатите, базирани на добива (E_yC_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 между чувствителността на двете променливи на растеж, тъй като стойностите просто са различни чисто математически. 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-реакция или продължителността на изпитването. Противоположно на това, резултатите, базирани на променливата на реакцията за добива, зависят от всички тези други променливи. E_yC_x зависи от специфичната скорост на растеж на вида водна леща, използван във всяко изпитване, както и от максималната специфична скорост на растеж, която може да варира между видовете и дори различните клонинги. Тази променлива на реакцията не следва да се използва за сравняване на чувствителността към токсични вещества между видовете водна леща и дори различните клонинги. 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, които също са включени в настоящия метод за изпитване, удовлетворяват действащите регулаторни изисквания в някои държави.

▼M1

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 вещества могат да въздействат на други измервани променливи много повече, отколкото броят на листовидните тела. Това въздействие не може да бъде открито само чрез изчисляване на броя на листовидните тела.

Броят листовидни тела, както и всяка друга записана измервана променлива, т.е. общата площ на листовидните тела, сухото тегло или свежото тегло, се табулират заедно с концентрациите на изпитваното вещество за всеки измерван случай. Последващият анализ на данни, например оценяването на LOEC, NOEC или EC_x, трябва да се основава на стойностите за отделните повторни проби, а не на изчислените средни стойности за група третирани проби.

2.2.1. **Средна специфична скорост на растеж**

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 всяка повторна проба 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

За всяка група от третирани проби и контролна група да се изчисли средната стойност за скоростта на растеж заедно с оценки на променливостта.

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 краят на изпитването). За всяка изпитвана и контролна концентрация да се изчисли средната стойност на скоростта за растеж заедно с оценки на променливостта. Допълнително трябва да се оцени скоростта на растеж сектор по сектор с цел да се оценят въздействията на изпитваното вещество, 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 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 времевия интервал на максимално потискане с тези за контролните проби за същия времеви интервал.

▼M1

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:

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

където:

— % I_r: процентното потискане на средната специфична скорост на растеж

— μ_C: средната стойност за μ в контролната проба

— μ_T: средната стойност за μ в групата от третирани проби

2.2.2. **Добив**

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 проба, използвана за инокулацията на съдовете за изпитване (вж. втората алинея от раздел 1.7.3). За всяка изпитвана концентрация и контролна концентрация да се изчисли средната стойност на добива заедно с оценки на променливостта. Средното процентно потискане на добива (% I_y) може да се изчисли за всяка група от третирани проби, 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 третирани проби

2.2.3. **Построяване на кривите „концентрация—реакция“**

Трябва да се построят кривите концентрация—реакция, които дават съотношението на средното процентно потискане на променливата на реакцията (I_r или I_y, изчислени както е показано в последната алинея от раздел 2.2.1 или в раздел 2.2.2) и логаритъма на концентрацията на изпитваното вещество.

2.2.4. **Оценяване на EC_x**

Оценките на EC_x (например EC_{50}) следва да се базират както на средната специфична скорост на растеж (E_rC_x), така и на добива (E_yC_x), като всяка от тях от своя страна 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 вещества, който оказват различно въздействие върху броя на листовидните тела и други измервани променливи. Следователно исканите параметри за токсичност са четирите стойности на EC_x за всяко изчислено ниво x на потискане на растежа: E_rC_x (брой на листовидните тела); E_rC_x (обща площ на листовидните тела, сухо тегло или свежо тегло); E_yC_x (брой на листовидните тела); и E_yC_x (обща площ на листовидните тела, сухо тегло или свежо тегло).

▼**M1**

2.3. СТАТИСТИЧЕСКИ ПРОЦЕДУРИ

Целта е да се получи количествено съотношение концентрация—реакция чрез регресивен анализ. Може да се използва тегловна линейна регресия след извършване на линеаризираща трансформация на данните от ответната реакция — например в единици пробит или логит или Weibull (16), но предпочитаните техники са тези на нелинейната регресия, които по-добре обработват неизбежните неравномерности и отклонения от гладките разпределения. При приближаване на нулево или пълно потискане подобни неравномерности може да бъдат увеличени от трансформацията, като по този начин пречат на анализа (16). Трябва да се отбележи, че стандартните методи за анализ с помощта на преобразования на пробит, логит или Weibull са предназначени за използване за количествени данни (например смъртност или оцеляване) и трябва да се модифицират, за да се приспособят към данните за скоростта на растежа или добива. Специфични процедури за определяне на стойностите на EC_x от непрекъснати данни могат да се намерят в (17), (18) и (19).

За анализа на всяка от променливите на реакцията да се използва съотношението концентрация—реакция, за да се изчислят точковите оценки на стойностите на EC_x. По възможност трябва да се определят 95 % доверителни граници за всяка от оценките. Адекватността на данните от реакцията спрямо регресивния модел може да се оцени графично или статистически. Регресивният анализ трябва да се извърши, като се използват реакциите на отделните повторни проби, а не средните стойности на група от третирани проби.

Оценките на EC_{50} и доверителните граници могат да се получат също и чрез използване на линейна интерполация с оценка на извадковата грешка (20), ако наличните регресивни модели/-методи са неподходящи за данните.

За оценяване на LOEC и следователно на NOEC е необходимо да се сравнят средните стойности на третирана проба, като се използва техниките за анализ на променливостта (ANOVA). Средната стойност за всяка концентрация след това трябва да се сравни със средната стойност на контролна проба с помощта на съответния метод за многократно сравняване или на изпитване за тенденция. Могат да се използват изпитвания на Dunnett или на William (21)(22)(23)(24). Необходимо е да се оцени дали предположението ANOVA за хомогенност на променливостта се запазва. Тази оценка може да се извърши графично или чрез изпитване за формална значимост (25). Подходящи са изпитванията на Levene или на Bartlett. Невъзможността за удовлетворяване на предположението за хомогенност на променливостта понякога може да се коригира чрез логаритмична трансформация на данните. Ако хетерогенността е много голяма, следва да се обмисли анализ с методи като низходящите изпитвания на Jonkheere за тенденцията. Допълнителни насоки относно определянето на NOEC могат да се намерят в (19).

Най-скорошните научни разработки водят до препоръка да бъде изоставена концепцията за NOEC и тя да бъде заменена с регресия, базирана на точкови оценки на EC_x. Не е установена подходяща стойност на x за това изпитване на *Lemna*. Но изглежда, че диапазонът от 10 до 20 % е подходящ (в зависимост от избраната променлива на реакцията) и за предпочитане е да бъде отчетена както стойността EC_{10}, така и EC_{20}.

3. **ОТЧИТАНЕ**

3.1. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО

Протоколът от изпитването трябва да включва следното:

Изпитвано вещество:

— физическа природа и физикохимични свойства, включително граница на водоразтворимост;

▼M1

— данни за химичната идентификация (например CAS номер), включително чистота.

Изпитвани видове:

— научно наименование, клонинг (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 експерименталната постановка: съдове за изпитване и капаци, 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 повторните проби за една концентрация;

— методи за приготвяне на изходните и изпитваните разтвори, включително използването на всякакви разтворители или дисперсанти;

— температура по време на изпитването;

— източник на светлина, интензитет на светлината и хомогенност;

— стойности на pH за изпитваните и контролните среди;

— концентрации на изпитваното вещество и метод за анализ със съответните данни за оценка на качеството (изследвания за достоверност, 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 стойност;

— криви на растежа за всяка концентрация (препоръчително с логаритмично преобразувана измервана стойност, вж. втората алинея от раздел 2.2.1);

— време на удвояване/скорост на растеж в контролната проба на базата на броя листовидни тела;

— изчислените зависими променливи за всяка третирана повторна проба със средните стойности и коефициент на променливост за повторните проби;

— графично представяне на съотношението концентрация—въздействие;

— оценки на крайните точки на токсичност за променливите на реакцията, например EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, и съответните доверителни интервали. Ако са изчислени, LOEC и/или NOEC и статистическите методи, използвани за тяхното определяне;

▼M1

— ако е използван ANOVA, размерът на въздействието, което може да се открие (например най-малката значима разлика);

— всякакво стимулиране на растежа, открито в някоя третирана проба;

— всякакви визуални знаци 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.

4. **ЛИТЕРАТУРА**

(1) OECD TG 221 (2006) *Lemna* Sp. Growth Inhibition Test

(2) The use of *Lemna* studies for coloured substances is detailed in Section 13.5.3 of the EU Manual of Decisions dated July 2006, at http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals

(3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment — Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues, available at

http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/-information_requirements_en.htm?time=1234958685#A

(4) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. 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.

(5) USEPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96—156. 8pp.

(6) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90—337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

(7) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

(8) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37—120 pp

(9) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(10) Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999) The ОИСР *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft ОИСР Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

(11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23.

(12) ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.

▼**M1**

(13) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3—77 108. September 1977.

(14) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, 353—359.

(15) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 481—483.

(16) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713—718.

(17) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157—167.

(18) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, 1485—1494.

(19) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(20) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05—88. USEPA, Duluth, MN.

(21) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096—1121.

(22) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482—491.

(23) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103—117.

(24) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510—531.

(25) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93—96.

▼M1

Допълнение 1

Описание на вида *Lemna*

Водното растение *Lemna*, обикновено наричано водна леща, принадлежи на семейството *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), а много тънък корен излиза от центъра на долната повърхност на всяко листовидно тяло. Видът *Lemna* 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 структура, безполовото размножаване и краткото време за създаване на поколение правят растението много подходящо за лабораторни изпитвания (4)(5).

Поради възможно междувидово вариране по отношение на чувствителност, валидни са сравнения на чувствителността единствено в рамките на един вид.

Примери за видове *Lemna*, които са били използвани за изпитване: Референтни 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 (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96—156. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90—337: Détermination de l’inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, 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 (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96—156. 8pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959—1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87—96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481—483.

▼M1

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102—2111.

Източници на видове *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tel: +1–416–978–3641
Fax:+1–416–978–5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca
http://www.botany.utoronto.ca/utcc

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
http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

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.

▼M1

Допълнение 2

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 *Lemna* 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 преместват с помощта на стерилна 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 химически чисти (промити с киселина) и стерилни стъклени съдове за културите, както и да се прилага асептична техника за манипулиране. При замърсяване на изходната култура, например с водорасли и гъби, е необходимо да се вземат мерки за премахване на замърсяващите организми. При замърсяване с водорасли и много 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 инокулиране на нови култури.

▼M1

Допълнение 3

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 AAP. Съставните елементи на двете среди са дадени по-долу. При приготвянето на тези среди трябва да се използват реактиви или химикали с аналитично качество и дейонизирана вода.

Среда на растеж за Lemna съгласно шведски стандарт (SIS)

— Изходните разтвори I—V се стерилизират чрез обработка в автоклав (120 °C, 15 минути) или чрез мембранно филтриране (размер на порите приблизително 0,2 μm).

— Изходният разтвор VI (и по избор VII) се стерилизират само чрез мембранно филтриране; те не трябва да се обработват в автоклав.

— Стерилните изходни разтвори трябва да се съхраняват на тъмно и хладно. Изходните разтвори I—V трябва да се изхвърлят след шест месеца, докато изходният разтвор VI (и по избор VII) има срок на съхранение един месец.

Изходен разтвор №	Вещество	Концентрация в изходния разтвор ($g \cdot l^{-1}$)	Концентрация в приготвената среда ($mg \cdot l^{-1}$)	Приготвена среда	
				Елемент	Концентрация ($mg \cdot l^{-1}$)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA·$2H_2O$	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:

— 10 ml от изходен разтвор I

— 5 ml от изходен разтвор II

— 5 ml от изходен разтвор III

— 5 ml от изходен разтвор IV

▼M1

— 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 вещества (вж. последната алинея от раздел 1.4).

— Стойността на pH се регулира на 6,5 ± 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 AAP

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 (A1, A2, A3, B и C) се приготвят за средата 20X — AAP с помощта на химикали с аналитично качество. 20 ml от всеки хранителен изходен разтвор се добавят към приблизително 850 ml дейонизирана вода за изготвяне на средата на растеж. Стойността на pH се регулира до 7,5 ± 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 филтрира 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 pH да се стабилизира. Стойността на pH 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 M NaOH или HCl, както е описано по-горе.

№ на изходен разтвор	Вещество	Концентрация в изходния разтвор ($g \cdot l^{-1}$) ([1])	Концентрация в приготвената среда ($mg \cdot l^{-1}$) (*)	Приготвена среда	
				Елемент	Концентрация ($mg \cdot l^{-1}$) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4;3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 $mg \cdot l^{-1}$	66 $\mu g \cdot l^{-1}$	Zn	31 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 $mg \cdot l^{-1}$	29 $\mu g \cdot l^{-1}$	Co	7,1 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 $mg \cdot l^{-1}$	145 $\mu g \cdot l^{-1}$	Mo	58 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 $mg \cdot l^{-1}$	0,24 $\mu g \cdot l^{-1}$	Cu	0,080 $\mu g \cdot l^{-1}$
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Освен ако не е посочено.

▼M1

Бележка под линия: Теоретично подходящата крайна концентрация на бикарбонат (при която ще се избегне съществено регулиране на стойността на pH) е 15 mg/l, а не 300 mg/l. В исторически план обаче ползването на средата 20X-AAP, включително кръговото изпитване за настоящия метод, се базира на 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse и R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

Среда на Steinberg (съгласно ISO 20079)

Концентрации и изходни разтвори

— Модифицираната среда на Steinberg се използва в ISO 20079 само за *Lemna minor* (само ако там се разрешава *Lemna minor*), но изпитванията са показали, че могат да се постигнат добри резултати също и с *Lemna gibba*.

— При приготвяне на средата трябва да се използват реактиви или химикали с аналитично качество и дейонизирана вода.

— Хранителната среда да 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)

Вещество		Хранителна среда	
Макроелементи	Моларна маса	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41
Микроелементи	Моларна маса	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
Двунатриев дихидрат на EDTA	372,24	1 500,00	4,03

▼**M1**

Таблица 2

Изходни разтвори (макроелементи)

1. **Макроелементи (50-кратно концентрирани)**	g/l
Изходен разтвор 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Изходен разтвор 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Изходен разтвор 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Таблица 3

Изходни разтвори (микроелементи)

2. **Микроелементи (1 000-кратно концентрирани)**	mg/l
Изходен разтвор 4:	
H_3BO_3	120,0
Изходен разтвор 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Изходен разтвор 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Изходен разтвор 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Изходен разтвор 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
Двунатриев дихидрат на EDTA	1 500,00

— Изходните разтвори 2 и 3 и отделно разтворите от 4 до 7 могат да бъдат обединени (като се вземе под внимание нужната концентрация).

— За по-дълъг срок на съхранение изходните разтвори да се обработват в автоклав при 121 °C в течение на 20 минути или алтернативно да се извърши стерилна филтрация (0,2 μm). За изходен разтвор 8 настоятелно се препоръчва стерилната филтрация (0,2 μm).

Приготвяне на крайната концентрация на средата на Steinberg (модифицирана)

— Добавете 20 ml от изходните разтвори 1, 2 и 3 (вж. таблица 2) към около 900 ml дейонизирана вода, за да се избегне утаяването.

— Добавете 1,0 ml от изходни разтвори 4, 5, 6, 7 и 8 (вж. таблица 3).

— Стойността на pH трябва да е 5,5 ± 0,2 (регулирайте чрез добавяне на минимално количество разтвор на NaOH или HCl)

▼M1

— Регулирайте 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

— Добавете 20 ml от изходните разтвори 1, 2 и 3 (вж. таблица 2) към около 900 ml дейонизирана вода, за да се избегне утаяването.

— Добавете 1,0 ml от изходните 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 е извършена 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 ± 0,2.

▼M4

B.27 ИЗПИТВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ЗА ХИРОНОМИДИ В СИСТЕМА ВОДА–СЕДИМЕНТ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА СЕДИМЕНТ С ДОБАВКА

УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на Насоките за изпитване (НИ) на ОИСР 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 хирономиди в първи ларвен стадий се излагат на обхват от концентрации на изпитвания химикал в система вода – седимент. Изпитваното вещество се добавя към седимента и ларвите в първи ларвен стадий се въвеждат в изпитвателните бехерови чаши, в които концентрацията на вода и седимент са били стабилизирани. В края на изпитването се измерва имагинирането на хирономидите и скоростта им на развитие. Може също да се измери и преживяването и теглото на ларвите след 10 дни, ако е необходимо (като се използват, ако трябва, допълнителни повторения). Данните се анализират, като се използва регресионен модел, за да се оцени концентрацията, която предизвиква намаляване с x % на растежа или на имагинирането или преживяването на ларвите (напр. EC_{15}, EC_{50} и т.н.), или като се използва проверка на статистическа хипотеза за определяне на NOEC/LOEC. Последното изисква сравнение на стойностите, при които се наблюдава въздействие, с контролните стойности, като се използват статистически проверки.

ИНФОРМАЦИЯ ОТНОСНО ИЗПИТВАНОТО ВЕЩЕСТВО

8. Разтворимостта във вода и парното налягане на изпитваното вещество, измереното или изчисленото му разпределение в седимента и стабилността му във вода и в седимент следва да са известни. Следва да е на разположение и надежден метод за анализ за количествено определяне на веществото във водата над седимента, във водата в порите и в седимента, чиито точност и граница на откриване са известни и отчетени. 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 pH 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 pH 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 cm^2 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 pH 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 хирономидите, или да се хранят с тях. Препоръчва се също така, преди използването му в изпитване за токсичност за хирономиди, 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 B.8 (14):

а) 4—5 % торф (сухо тегло): с pH възможно най-близко до обхвата 5,5—6,0; важно е да се използва торф под формата на прах, ситно смлян (размер на частиците 1 mm) и изсушен само с въздух;

б) 20 % каолин (сухо тегло) (за предпочитане съдържанието на каолинит да е повече от 30 %);

в) 75—76 % кварцов пясък (сухо тегло) (трябва да преобладава финият пясък с размер на 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 ($CaCO_3$), за да се коригира pH 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 хирономидите оцеляват в нея за времето на отглеждане и изпитване, без да показват признаци на стрес. В началото на изпитването pH на водата за изпитване трябва да бъде между 6 и 9, а общата ѝ твърдост — не по-висока от 400 mg/l, изразена като $CaCO_3$. 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 дейонизирана вода, се смесва с приготвения седимент с помощта на валцова мелница, смесител за фураж, или смесване с ръка. Ако е малко разтворимо във вода, изпитваното вещество може да бъде разтворено във възможно най-малък обем подходящ органичен разтворител (например хексан, ацетон или хлороформ). След това този разтвор се смесва с 10 g фин кварцов пясък за всеки съд за изпитване. Оставя се разтворителят да се изпари и същият следва да бъде напълно елиминиран от пясъка; тогава пясъкът се смесва с необходимото количество седимент за всяка бехерова чаша за изпитването. За разтваряне, диспергиране или емулгиране на изпитваното вещество могат да се използват само средства, които лесно се изпаряват. Трябва да се помни, че пясъкът, добавен заедно с изпитваното вещество и пясъчната смес, трябва да се взема предвид при приготвянето на седимента (т.е., седиментът трябва следователно да се приготвя с по-малко количество пясък). Трябва да се внимава изпитваното вещество, добавено към седимента, да бъде старателно и равномерно разпределено в целия му обем. Ако е необходимо, може да се анализират проби от пробите, за да се определи степента на хомогенност.

ПЛАН НА ИЗПИТВАНЕТО

17. Планът на изпитването се отнася до избор на броя на стойностите на концентрацията на изпитване и интервалите между тези стойности, броя на съдовете за всяка концентрация и броя на ларвите във всеки съд. Описани са 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. EC_{15}, EC_{50}) 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 EC_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, взимащи 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-Whithey, 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 B.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 финитe 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 уравновесяване, равен на 48 часа. в края на този допълнителен период, следва да се измери концентрацията на изпитваното вещество във водата над седимента, водата в порите и водата в седимента, най-малкото при най-високата и при по-ниска концентрация (вж. точка 38). Посочените измервания на изпитваното вещество дават възможност за изчисляване на масовия баланс и изразяване на резултатите въз основа на измерените концентрации.

Добавяне на организмите за изпитването

25. Четири до пет дни преди добавянето на организмите за изпитването в съдовете за изпитване, агломератите от яйца следва да се извадят от съдовете за отглеждане и да се сложат в малки съдове в среда за отглеждане. Може да се използва зряла среда от 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 pH 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. yoshimatui*) 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 развитите 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 „Пастьор“, 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). Препоръчваните за *C. tentans* и *C. yoshimatui* 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 имагинирали мъжки и женски насекоми. Мъжките лесно се разпознават по перестите си антени.

36. Съдовете за изпитване се наблюдават най-малко три пъти седмично, за да се оцени визуално дали не е налично ненормално по отношение на контролите поведение (напр. напускане на седимента, необичайно плуване). През периода, когато се очаква имагинирането на насекомите, е необходимо ежедневно броене на имагиниралите индивиди. Полът и броят на напълно имагиниралите насекоми се записва всеки ден. След разпознаване насекомите се изваждат от съдовете. Всички агломерати яйца, снесени преди завършването на изпитването, се записват и изваждат, за да се предотврати повторно въвеждане на ларви и седимента. Броят на видимите пашкули, които не са 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 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 хирономиди, 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-r × 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 посилни 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 имагиниралите, така и на неимагиниралите хирономиди надвишава пет за всяко повторение (съд).

48. За да се приложат методите на ANOVA, стойностите на СИ трябва първо да се преобразуват с трансформация арксинус–корен квадратен или с трансформация Freeman-Tukey, за да се получи приблизително нормално разпределение и да се изравнят дисперсиите. По отношение на коефициента на имагиниране може да се използва тестът на Cochran-Armitage, точният тест на Fisher (с корекция на Bonferroni), или тестовете на Mantel-Haenszel при използване на абсолютни честоти. Трансформацията арксинус–корен квадратен се прилага, като се вземе реципрочната стойност на синус (sin^{-1}) от квадратния корен на СИ.

49. Стойностите EC_x за съотношението на имагиниране се изчисляват с помощта на регресионен анализ (или напр. probit (22), logit, Weibull, подходящо достъпно срещу заплащане програмно осигуряване, и т.н.). Ако регресионният анализ е неуспешен (т.е., ако има по-малко от два частични отговора), използват се други непараметрични методи, напр. плаващо средно или проста интерполация

Скорост на развитие

50. Средното време на развитие е средният интервал между въвеждането на ларвите (ден 0 на изпитването) и имагинирането на експерименталната кохорта насекоми. (За изчисляването на действителното време за развитие следва да се вземе предвид възрастта на ларвите в момента на въвеждане). Скоростта на развитие е реципрочна на времето на развитие (единица: 1/ден) и отговаря на частта от развитието на ларвите, която се извършва за един ден. Скоростта на развитие се предпочита в оценката на изследванията на токсичността на седимента, тъй като нейната дисперсия е по-ниска и тя е по-хомогенна и по-близка до нормалното разпределение, отколкото средното време на развитие. Поради това могат да се използват мощни параметрични тестови процедури, в които се използва по-скоро скоростта на развитие, а не времето за развитие. По отношение на скоростта на развитие като непрекъснат отговор, стойностите на EC_x могат да се оценят с използване на регресионен анализ (напр. (23), (24).

51. В посочените по-долу статистически тестове се приема, че насекомите, наблюдавани в деня за инспекция x, са достигнали до стадия на имаго в средата на интервала между ден x и ден x–1 (l = дължина на периода на инспекция, обикновено един ден). средната скорост на развитие за съд ($\bar{x}$) се изчислява по формулата:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼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

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

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: pH, съдържание на органичен въглерод, съотношение C/N и зърнометричен състав (ако е подходящо),

— подготовка на синтетичния седимент: съставки и характеристики (съдържание на органичен въглерод, pH, 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, pH, 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., pH, 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.

ПРЕПРАТКИ:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼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 B.8 от настоящото приложение, Токсичност за червеи

(15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. 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 имагиниралите възрастни

7. Някои експериментатори изказват идеята, че тампон от памук, напоен с наситен разтвор на захароза, може да се използва за хранене на достигналите до стадий на имаго възрастни.

▼M4

Имагиниране

8. При температура от 20 °C ± 2 °C след приблизително 13—15 дни от съдовете за отглеждане на ларви ще започнат да имагинират възрастните насекоми. Мъжките лесно се разпознават по това, че имат перести антени.

Агломерати от яйца

9. Щом в съдовете за развъждане има наличие на възрастни насекоми, всички съдове за отглеждане трябва да се проверяват три пъти седмично за наличие на желеобразни маси яйца. Ако са налице, масите яйца следва да бъдат внимателно отстранени. Те следва да се преместят в малко блюдо, съдържащо проба от водата за развъждане. Масите яйца се използват за създаване на нов съд за отглеждане (напр. 2—4 маси яйца/съд) или се използват в изпитванията за токсичност.

10. След 2—3 дни следва да се излюпят ларви от първи стадий.

Създаване на нови съдове за отглеждане

11. След като е положено началото на отглеждането, следва да е възможно да се създава нов съд за отглеждане на ларви всяка седмица или по-рядко, в зависимост от изискванията на изпитването, като старите съдове се изваждат от изпитването, след като преобразяването на ларвите в имаго завърши. Използването на тази система позволява редовно получаване на възрастни насекоми с минимални грижи за управление.

Приготвяне на разтвори за изпитване „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 $NaSiO_3 \cdot 5\ H_2O$, $NaNO_3$, 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

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

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 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
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (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
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (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 автоклавират.

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 (ml/l)	Крайни концентрации в разтвори за изпитване M4 и M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

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 (ml/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

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 pH 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 (± 0,5)
Калциев карбонат	$CaCO_3$ на прах, химически чист	0,05 - 0,1
Вода	Проводимост ≤ 10 μS/cm	30 - 50

Приготвяне

Торфът се изсушава с въздух и се смила на фин прах. Приготвя се суспензия от желаното количество торф на прах в дейонизирана вода, като се използва високопроизводително хомогенизиращо устройство. Като се използва $CaCO_3$, pH на суспензията се коригира до 5,5 ± 0,5. Суспензията се аклиматизира най-малко два дни при 20 °C ± 2 °C, като се разбърква леко, за да се стабилизира pH и да се създаде стабилна микробна среда. Отново се измерва pH, което трябва да бъде 6,0 ± 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 pH на крайната смес и, ако е необходимо, се коригира до 6,5—7,5 с $CaCO_3$. Вземат се проби от седимента, за да се определи сухото тегло и съдържанието на органичен въглерод. Освен това, препоръчва се преди използването му в изпитване за токсичност за 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 B.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

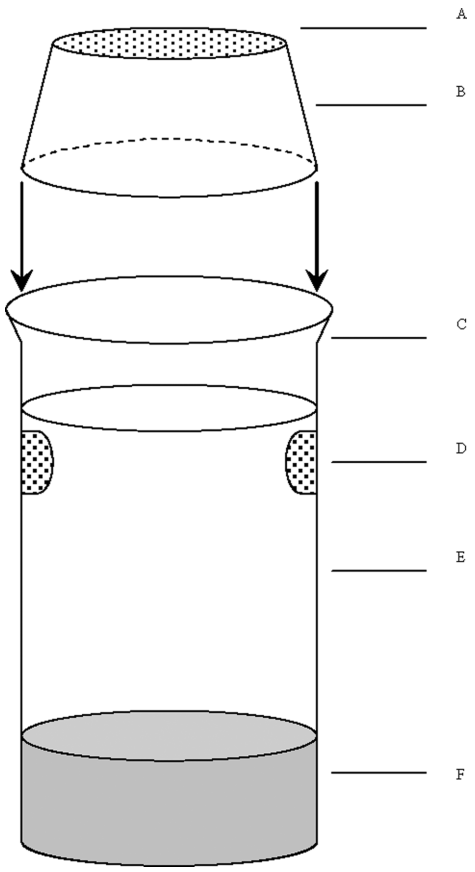
(*) Трябва обаче да се отбележи, че ако се предполага взаимодействие между йоните, от които произтича твърдостта, и изпитваното вещество, следва да се използва вода с по-ниска твърдост (и затова в този случай не трябва да се използва среда „Elendt M4“).

▼**M4**

Допълнение 5

Насоки за наблюдение на имагинирането на ларвите на хирономидите

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

B: обърнати пластмасови панички

C: чаша за експозиция без улей

D: екранирани отвори за смяна на водата

E: вода

F: седимент

▼M4

B. 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 ОИСР 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 взима 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 концентрациите във водата в порите. Той е полезен също и за други типове експозиция (в това число разливане на химикали), освен процесите на натрупване, които продължават по-дълго от времетраенето на изпитването.

3. Веществата, които трябва да бъдат изпитани с помощта на организми, живеещи в седимента, обикновено са задържат в тази естествена среда за дълги периоди от време. Живеещите в седимента организми могат да бъдат засегнати по различни начини. Относителната важност на всеки път на експозиция и времето, необходимо за всеки от тях да способства за общото токсично въздействие, зависят от физико–химичните свойства на съответния химикал. За силно адсорбиращите химикали (напр. с log K_{ow} > 5) или за вещества, които образуват ковалентна връзка със седимента, поглъщането на замърсена храна може да бъде значим път на експозиция. За да не се подцени токсичността на силно липофилните вещества, може да се разгледа възможността за добавяне на храна в седимента, преди да бъде приложено изпитваното вещество. За да се вземат предвид всички възможни пътища на експозиция, настоящият метод за изпитване е ориентиран главно към експозицията в дългосрочен план. Продължителността на изпитването е от 20 до 28 дни за *C. riparius* и *C. yoshimatsui* и 28—65 за *C. tentans.* Ако за определена специфична цел се изискват данни в краткосрочен план, за да се изследва например въздействието на нестабилни химикали, допълнителните повторения, включени в изпитването, могат да се прекратят след период от десет дни.

4. Измерваните крайни точки са общият брой на имагиниралите възрастни насекоми и времето, което е изтекло до достигането на стадия на имаго. Ако са необходими допълнителни данни в краткосрочен план, препоръчва се измерването на преживяването и растежа на ларвите да се извършва едва след десетдневен период, като се използват, ако е необходимо, допълнителни повторения.

5. Препоръчва се употребата на приготвен седимент. Приготвеният седимент има някои преимущества пред естествените седименти:

— намалява се експерименталното вариране, тъй като приготвеният седимент играе ролята на „стандартна матрица“ и отпада необходимостта да се намират източници на незамърсен и чист седимент,

— изпитванията могат да започнат по всяко време, без да се влияят от сезонната променливост на включения в изпитването седимент, и без да се налага седиментът да се подлага на предварителна подготовка за отстраняване на 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 хирономиди 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 хирономидите и скоростта им на развитие. Може също да се измери и преживяването и теглото на ларвите след 10 дни, ако е необходимо (като се използват 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 pH 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 pH 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 cm^2 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 използват 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 pH 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 хирономидите, или да се хранят с тях. Препоръчва се също така, преди използването му в изпитване за токсичност за хирономиди, 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 B.8 (14):

а) 4—5 % торф (сухо тегло); с pH възможно най-близко до обхвата 5,5—6,0; важно е да се използва торф под формата на прах, ситно смлян (размер на частиците < 1 mm) и изсушен само с въздух;

б) 20 % каолин (сухо тегло) (за предпочитане съдържанието на каолинит да е повече от 30 %);

в) 75—76 % кварцов пясък (сухо тегло) (трябва да преобладава финият пясък с размер на частиците между 50 и 200 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 ($CaCO_3$), за да се коригира pH на крайната смес на седимента до 7,0 ± 0,5;

е) 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).

▼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 хирономидите оцеляват в нея за времето на отглеждане и изпитване, без да показват признаци на стрес. В началото на изпитването pH на водата за изпитване трябва да бъде между 6 и 9, а общата ѝ твърдост — не по-висока от 400 mg/l, изразена като $CaCO_3$. Ако обаче се предполага взаимодействие между отговорните за твърдостта йони и изпитваното вещество, следва да се използва вода с по-ниска твърдост (и затова в този случай не трябва да се използва среда „Elendt M4“). По време на цялото изпитване трябва да се използва един и същи тип вода. Качествените параметри на водата, изброени в допълнение 4, следва да се измерват поне два пъти годишно или всеки път когато има подозрение, че тези характеристики може да са се променили значително.

Изходни разтвори — вода с добавка

16. Концентрациите, при които се прави изпитването, се изчисляват въз основа на концентрациите в обема на водата, т.е., водата над седимента. Разтворите с избраните концентрации, които ще се ползват в изпитването, обикновено се приготвят чрез разреждане на изходния разтвор. Изходните разтвори се приготвят за предпочитане чрез разтваряне на изпитваното вещество в изпитвателната среда. В някои случаи може да се наложи да се използват разтворители или диспергиращи агенти, с цел да се получи изходен разтвор с подходяща концентрация. Като подходящи разтворители могат да се посочат: ацетон, етанол, метанол, моноетилов етер на етиленгликола, диметилов етер на етиленгликола, диметилформамид и триетиленгликол. Като диспергиращи агенти могат да се използват Cremophor RH40, Tween 80, метилцелулоза 0,01 % и HCO-40. Когато се използва подпомагащ 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 подпомагащ разтварянето агент, той не трябва да оказва значително въздействие върху преживяването, нито видимо неблагоприятно въздействие върху ларвите на хирономидите, 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 EC, 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. EC_{15}, EC_{50}) 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

▼M4

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_x, 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 Willams (17)(18)(19)(20). По отношение на коефициента на имагиниране може да се използва тестът на Cochran-Armitage, точният тест на Fisher (с корекция на Bonferroni), или тестът на Mantel-Haenszel.

Гранично изпитване

21. Може да се предприеме гранично изпитване (с една концентрация за изпитване и една контрола), ако не е наблюдавано въздействие в предварителното изпитване за определяне на обхвата. Предназначението на граничното изпитване е да се покаже, че стойността, при която изпитваното вещество има токсично въздействие, е по-висока от изпитаната гранична стойност на концентрацията. Не е възможно да се препоръча някаква определена стойност на концентрацията в рамките на настоящия метод за изпитване, това се оставя на преценката на регулаторния орган. Обикновено са необходими най-малко шест повторения както на третираните проби, така и на контролата. Следва да се докаже достатъчно статистическа мощност за откриване на разлика от 20 % по отношение на контролата при равнище на значимост от 5 % (p = 0,05). По отношение на метричния отговор (скорост на развитие и тегло), t-тестът е подходящ статистически метод, ако данните отговарят на изискванията на изпитването (нормалност, хомогенни дисперсии). Може да се използва и t-тест с нееднаква дисперсия или непараметричен тест, напр. тест на Wilcoxon-Mann-Whithey, 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 слоят 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 финитe 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 EC 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 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 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 pH 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. yoshimatui*) 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 развитите 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 „Пастьор“, 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). Препоръчваните за *C. tentans* и *C. yoshimatui* 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 имагинирали 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. pH, концентрацията на разтворения кислород във водата за изпитване и температурата на съдовете за изпитване следва да се измерват по подходящ начин (вж. точка 10). Твърдостта и амонякът се измерват в контролните съдове и в един съд за изпитване при най-високата концентрация в началото и в края на изпитването.

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 хирономиди, 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-r × 2. Преживяването на ларвите и средното индивидуално сухо тегло за всеки съд може да се определи след 10 дни, когато това се изисква.

43. Концентрациите, оказващи въздействие, изразени като концентрации във водата над седимента, се изчисляват за предпочитане въз основа на измерените концентрации в началото на изпитването (вж. точка 38).

44. За да се изчисли конкретна прогнозна стойност на EC_{50} или всяка друга стойност EC_x, статистическите данни за всеки съд може да се използват като истински повторения. При изчисляването на доверителния интервал за всяка стойност на EC_x, трябва да се вземе предвид варирането между съдовете, или трябва да се покаже, че то е толкова малко, че може да се пренебрегне. Когато моделът е коригиран с помощта на метода на най-малките квадрати, трябва да се приложи трансформация към статистическите данни за съд, за да се подобри хомогенността на дисперсията. Стойностите обаче на EC_x следва да се изчисляват след като резултатите се преобразуват обратно в изходни стойности.

45. Когато със статистическия анализ се цели определяне на NOEC/LOEC чрез проверка на хипотези, дисперсията между съдовете трябва да се взема под внимание, напр. с помощта на „вложена“ ANOVA. Напротив, при ситуации, в които са налице нарушения на обичайните допускания на ANOVA, може да се окажат полезни по-мощни критерии (21).

Съотношение на имагиниране

46. Стойностите на съотношението на имагиниране (СИ) са данни с две възможни алтернативни значения и могат да се анализират с теста на Cochran-Armitage, който се прилага регресивно, когато се очаква монотонна зависимост между дозата и отговора, а тези данни потвърждават очакванията. В противен случай може да се използва точният тест на Fisher или тестът на Mantel-Haenszel с коригирани по Bonferroni-Holm p-стойности. Ако между повторения при една и съща концентрация са налице данни за по-голямо вариране, отколкото би показало биномно разпределение (често наричано „екстра биномна“ вариация), се прилага устойчив тест на Cochran-Armitage или точен тест на Fisher, както се предлага в (21).

47. Сборът от достигналите до стадий на имаго насекоми на съд, n*e* 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 имагиниралите, така и на неимагиниралите хирономиди надвишава пет за всяко повторение (съд).

49. За да се приложат методите на ANOVA, стойностите на СИ трябва първо да се преобразуват с трансформация арксинус–корен квадратен или трансформация на Freeman-Tukey, за да се получи приблизително нормална дистрибуция и да се изравнят дисперсиите. По отношение на коефициента на имагиниране може да се използва тестът на Cochran-Armitage, точният тест на Fisher (с корекция на Bonferroni), или тестът на Mantel-Haenszel при използване на абсолютни честоти. Трансформацията арксинус–корен квадратен се прилага, като се вземе реципрочната стойност на синус ($\sin^{-1}$) от квадратния корен на СИ.

50. Стойностите EC_x за съотношението на имагиниране се изчисляват с помощта на регресионен анализ (или напр. probit (22), logit, Weibull, подходящо достъпно срещу заплащане програмно осигуряване, и т.н.). Ако регресионният анализ е неуспешен (т.е., ако има по-малко от два частични отговора), използват се други непараметрични методи, напр. плаващо средно или проста интерполация

Скорост на развитие

51. Средното време на развитие е средният период между въвеждането на ларвите (ден 0 на изпитването) и имагинирането на експерименталната кохорта от насекоми. (За изчисляването на действителното време за развитие следва да се вземе предвид възрастта на ларвите в момента на въвеждане). Скоростта на развитие е реципрочна на времето на развитие (единица: 1/ден) и отговаря на частта от развитието на ларвите, която се извършва за един ден. Скоростта на развитие се предпочита в оценката на изследванията на токсичността на седимента, тъй като нейната дисперсия е по-ниска, и тя е по-хомогенна и по-близка до нормалното разпределение, отколкото средното време на развитие. Поради това могат да се използват мощни параметрични тестови процедури, в които се използва скоростта на развитие, а не времето за развитие. По отношение на скоростта на развитие като непрекъснат отговор, стойностите на EC_x могат да се оценят с използване на регресионен анализ (напр. (23), (24).

52. В посочените по-долу статистически тестове се приема, че насекомите, наблюдавани в деня за инспекция x, са достигнали до стадия на имаго в средата на интервала между ден x и ден x–1 (l = дължина на периода на инспекция, обикновено един ден). средната скорост на развитие за съд (x) се изчислява по:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

където:

$\bar{x}$: средна скорост на развитие за съд

i: индекс на периода на инспекция

m: максимален брой периоди на инспекция

▼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

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

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: pH, съдържание на органичен въглерод, съотношение C/N и зърнометричен състав (ако е подходящо),

— подготовка на синтетичния седимент: съставки и характеристики (съдържание на органичен въглерод, pH, 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, pH, 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., pH, температура, разтворен кислород, твърдост и амоняк,

— замяна на изпарилата се вода от изпитването, ако има такава,

— брой на достигналите до стадий на имаго мъжки и женски насекоми за съд и за ден,

— брой ларви, недостигнали до стадий на имаго за съд,

— средно индивидуално сухо тегло на ларвите за съд, и ако е подходящо, за стадий,

— процент на достигане до стадий на имаго и концентрация на повторение (общо за мъжките и женските насекоми),

— средна скорост на развитие на достигналите до стадий на имаго насекоми за повторение и за концентрация (общо за мъжките и за женските насекоми),

— предварителни оценки на стойностите на крайни точки за токсичността, напр. EC_x (с свързаните с тях доверителни интервали), LOEC и/или NOEC, както и статистическите методи, използвани за тяхното определяне,

— обсъждане на резултатите, включително всякакво влияние върху резултата от изпитването, вследствие на отклонения от настоящия метод за изпитване.

ПРЕПРАТКИ:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼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 B.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 е постоянни характеристики на средата при 20 ± 2 °C със светъл период от 16 часа (интензитет около 1 000 lux) и 8 часа тъмнина. Докладвано е, че относителна влажност, по-ниска от 60 %, може да възпрепятства размножаването.

Вода за разреждане

3. може да се използва всяка естествена или синтетична вода. Практиката е да се използва вода от кладенец, чешмяна вода и изкуствена среда (напр. среда Elendt „M4“ или „M7“). Преди употреба водата трябва да бъде аерирана. Ако е необходимо, водата за отглеждане може да се обновява, като се внимателно се излива или изсмуква използваната вода от съдовете за отглеждане, без да се унищожават тръбичките на ларвите.

Хранене на ларвите

4. Ларвите на *Chironomus* трябва да се хранят с храна за риба на люспи (Tetra Min®, Tetra Phyll® или друга подобна търговска марка храна за риба) по около 250 mg на съд на ден. Храната може да се дава като сух смлян прах или като суспензия във вода: 1,0 g храна във вид на люспи се добавя към 20 ml вода за разреждане и се разбърква, за да образува хомогенна смес. Така полученият препарат може да се дава в количество от около 5 ml на съд дневно (като се разбърква преди употреба). По-старите ларви могат да получават повече храна.

5. Храненето се определя съобразно качеството на водата. Ако средата за отглеждане стане мътна, количеството храна трябва да се намали. Добавянето на храна се следи внимателно. Даването на прекалено малко храна ще предизвика миграция на ларвите в обема на водата, а твърде много храна ще предизвика увеличаване на дейността на микробите и по-ниски нива на кислорода. И двете обстоятелства могат да доведат до по-ниска скорост на развитие.

6. Могат също да се добавят и клетки от някои зелени водорасли (напр. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*), когато се подготвят нови съдове за отглеждане.

Хранене на имагиниралите възрастни

7. Някои експериментатори изказват идеята, че тампон от памук, напоен с наситен разтвор на захароза може да се използва за хранене на достигналите до стадий на имаго възрастни.

▼M4

Имагиниране

8. При температура от 20 °C ± 2 °C след приблизително 13—15 дни от съдовете за отглеждане на ларви ще започнат да имагинират възрастните насекоми. Мъжките лесно се разпознават по това, че имат перести антени.

Агломерати от яйца

9. Щом в съдовете за развъждане се поставят възрастни насекоми, всички съдове за отглеждане трябва да се проверяват три пъти седмично за наличие на пихтиести маси яйца. Ако са налице, масите яйца следва да бъдат внимателно отстранени. Те следва да се преместят в малко блюдо, съдържащо проба от водата за развъждане. Масите яйца се използват за създаване на нов съд за отглеждане (напр. 2—4 маси яйца/съд) или се използват в изпитванията за токсичност.

10. След 2—3 дни следва да се излюпят ларви от първи стадий.

Създаване на нови съдове за отглеждане

11. След като е сложено началото на отглеждането, следва да е възможно да се създава нов съд за отглеждане на ларви всяка седмица или по-рядко, в зависимост от изискванията на изпитването, като старите съдове се изваждат от изпитването, след като преобразяването на ларвите в имаго е завършило. Използването на тази система позволява редовно получаване на възрастни насекоми с минимална организация.

Приготвяне на разтвори за изпитване „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 $NaSiO_3$ $5H_2O$, $NaNO_3$, 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), 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		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
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ [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), 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		Крайна концентрации в разтворите за изпитване (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA $\cdot 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot 7H_2O$ (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 автоклавират.

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)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Таблица 3

Изходни разтвори на витамини за среди M4 и M7

Събират се всички три разтвора на витамини, за да се приготви един общ изходен разтвор на витамини

	Количество, разреждано до 1 l с дейонизирана вода (mg)	Количество разтвор на витамини, добавяно за приготвяне на среди M4 и M7 (mg/l)	Крайни концентрации в разтвори за изпитване M4 и M7 (mg/l)
Тиаминхидрохлорид	750	0,1	0,075
Цианокобаламин (B12)	10	0,1	0,0010
Биотин	7,5	0,1	0,00075

ПРЕПРАТКИ

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.

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 pH 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 (±0,5)
Калциев карбонат	$CaCO_3$ на прах, химически чист	0,05 - 0,1
Вода	Проводимост ≤ 10 μS/cm	30 - 50

Приготвяне

Торфът се изсушава с въздух и се смила на фин прах. Приготвя се суспензия от желаното количество торф на прах в дейонизирана вода, като се използва високопроизводително хомогенизиращо устройство. Като се използва $CaCO_3$, pH на суспензията се коригира до 5,5 ± 0,5. Суспензията се аклиматизира най-малко два дни при 20 °C ± 2 °C, като се разбърква леко, за да се стабилизира pH и да се създаде стабилна микробна среда. Отново се измерва pH, което трябва да бъде 6,0 ± 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 pH на крайната смес и, ако е необходимо, се коригира до 6,5—7,5 с $CaCO_3$. Вземат се проби от седимента, за да се определи сухото тегло и съдържанието на органичен въглерод. Освен това, препоръчва се преди използването му в изпитване за токсичност за 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 B.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

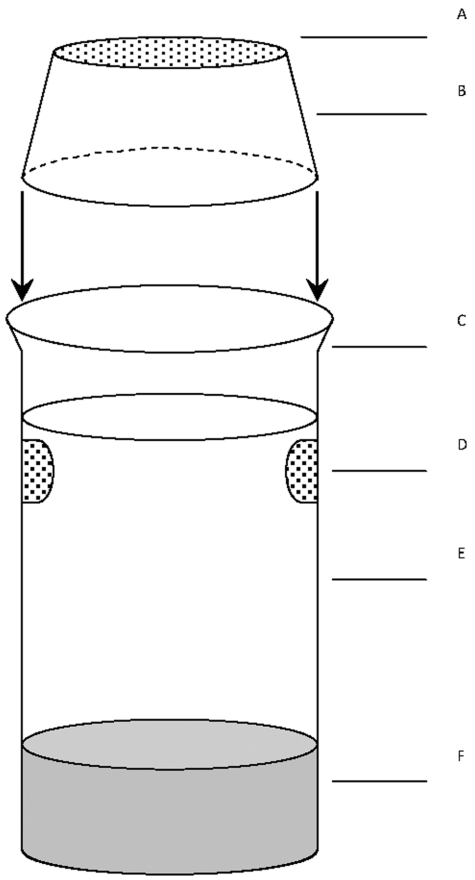
(*) Трябва обаче да се отбележи, че ако се предполага взаимодействие между йоните, от които произтича твърдостта, и изпитваното вещество, следва да се използва вода с по-ниска твърдост (и затова в този случай не трябва да се използва среда „Elendt M4“).

▼**M4**

Допълнение 5

Насоки за наблюдение на имагинирането на ларвите на хирономидите

Върху бехеровите чаши, в които се провежда изпитването, се поставят уловители за достигнали до стадия на имаго насекоми. Уловителите са необходими от 20-ия ден на изпитването до края му. Примерно устройство на уловителя е показано по-долу:



A: найлоново платно

B: обърнати пластмасови панички

C: чаша за експозиция без улей

D: екранирани отвори за смяна на водата

E: вода

F: седимент

▼M4

B.29. ЛЕСНА БИОРАЗГРАДИМОСТ — CO_2 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 B.4 от настоящото приложение A—E. Поради това, даден химикал, който има добри резултати при настоящия метод за изпитване, може да се смята за лесно биоразградим и следователно бързо разградим в околната среда.

2. Добре разработеният метод с използване на въглероден диоксид, основан на оригиналното изпитване на Sturm (2) за оценка на биоразградимостта на органични химикали чрез измерване на въглеродния диоксид, получен в резултат от дейността на микробите, обикновено се предпочита за изпитване на малко разтворими и силно адсорбируеми химикали Той се избира и за разтворими (но не летливи) химикали, тъй като много изследователи смятат, че излъчването на въглероден диоксид е единственото еднозначно доказателство на микробна активност. Елиминирането на разтворения органичен въглерод може да се осъществи чрез физични и химични процеси — адсорбция, изпаряване, утаяване, хидролиза, както и в резултат на микробна активност и много небиологични реакции, които поглъщат кислород; абиотичното получаване на въглероден диоксид от органични химикали се среща рядко. в оригиналното и в модифицираното изпитване на Sturm (1)(2) CO_2 се отделя от течната фаза в абсорбиращи съдове чрез барботиране (т.е., пропускане на мехурчета въздух през течната фаза за отделяне на CO_2), а във версията на Larson (3)(4) CO_2 се пренася от реакционния съд към абсорбери с помощта на въздух, несъдържащ CO_2, който преминава през пространството над течната фаза, като освен това изпитвателният съд непрекъснато се разклаща. Реакционният съд се разклаща само в модификацията на Larson; в ISO 9439 (5) и в оригиналната версия от САЩ (6) разбъркване се посочва само за неразтворими вещества, като и двата източника предписват по-скоро барботиране, отколкото замяна на газовата фаза от пространството над течната. В друг официален метод (7) на Агенцията на САЩ за защита на околната среда (US EPA), разработен въз основа на метода на Gledhill (8), разклащаният реакционен съд е изолиран от атмосферата, и произведеният CO_2 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 CO_2 в алкалните уловители не отразява вярно количеството CO_2, произвеждано от микроорганизмите в различни междинни моменти по време на разграждането. В резултат на това изискването, според което > 60 % от теоретично максималната продукция на CO_2 ($ThCO_2$) трябва да бъде получена в рамките на „10-дневен период“ (десетте дни непосредствено след достигането на биоразграждане от 10 %), за да може изпитваният химикал да бъде класифициран като лесно биоразградим, няма да може да бъде удовлетворено за някои химикали, които биха били класифицирани като такива, ако се използва методът, основан на елиминирането на разтворения органичен въглерод (DOC).

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 тласък на търсене на техника с херметично затворен съд, различна от тази на Gledhill, а не такава с преминаващ газ (10)(11). Boatman et al (12) преразгледаха по-ранните методи и възприеха затворена система със свободно пространство, в която CO_2 се освобождава в свободното пространство след инкубация с помощта на ацидификация на средата. CO_2 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) CO_2 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 CO_2.

7. Двата подхода са обединени в стандарта на ISO (изпитване на CO_2 в свободно пространство) (16), който е бил предмет на кръгово изпитване (17) и който е основата на настоящия метод за изпитване. В метода за изпитване на US EPA също така са били използвани и двата подхода (18). Бяха препоръчани два метода за измерване на CO_2, а именно измерване на CO_2 в свободното пространство над течността след ацидификация (13) и измерване на IC в течната фаза след добавянето на излишък на основа. Последният беше въведен от Peterson в 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 ОИСР 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 CO_2, получен в резултат на окончателното аеробно биоразграждане на изпитвания химикал, се определя чрез измерване на IC, отделен в стъклата за изпитване над количеството на IC, получен в контролните стъкла, които съдържат само инокулирана среда. Степента на биоразграждане се изразява като процент от теоретично максималната продукция на IC (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 $Pa.m^3.mol^{-1}$, тъй като частта на изпитвания химикал в свободното пространство няма да надхвърли 1 % (13). Може да се използва и свободно пространство с по-малък обем, когато се изпитват химикали с по-голяма летливост, но тяхната бионаличност може да се окаже ограничаващ фактор, особено ако са малко разтворими във вода. Трябва обаче да се следи обемното съотношение между свободното пространство и течността и концентрацията на изпитвания химикал да бъдат такива, че да е налице достатъчно кислород, който да даде възможност за осъществяване на пълно аеробно биоразграждане (т.е., да се избягва използването на висока концентрация на субстрата и малко свободно пространство). Насоки по тези въпроси може да се намерят в (13)(23).

РЕФЕРЕНТНИ ХИМИКАЛИ

12. За да се провери процедурата на изпитване, следва успоредно да се изпита и референтен химикал, чиято биоразградимост е известна. За тази цел при изпитването на разтворими във вода химикали могат да се използват анилин, натриев бензоат или етиленгликол, а за малко разтворимите изпитвани химикали — 1-октанол (13). Биоразграждането на посочените химикали трябва да достигне > 60 % от ThIC в рамките на 14 дни.

ВЪЗПРОИЗВОДИМОСТ

13. В кръговото изпитване на метода, извършено от ISO (17), бяха получени следните резултати при използване на препоръчаните условия, в това число 20 mg C изпитван химикал/l.

Изпитван химикал	Среден процент на биоразграждане (28 дни)	Коефициент на вариация (%)	Брой на лабораториите
Анилин	90	16	17
1-октанол	85	12	14

Варирането в рамките на изпитването (повторяемост), когато се използва анилин, е ниско, с коефициенти на вариране, не по-големи от 5 % в почти всички опити. В двата случая, когато повторяемостта е била по-лоша, по-голямото вариране вероятно е било причинено от висока продукция на IC в празните проби. Повторяемостта е била по-лоша с 1-октанол, но въпреки това е била по-ниска от 10 % в 79 % от опитите. Това по-голямо вариране в рамките на изпитването може да е било причинено от грешки в дозирането, поради малкия обем (3 до 4 μl) 1-октанол, който е трябвало да бъде инжектиран в запечатаните изпитвателни стъкла. Ако се използват по-ниски концентрации на изпитваните химикали, биха се получили по-високи коефициенти на вариация, особено при концентрации, по-ниски от 10 mg C/l. Този проблем би могъл да се преодолее частично с намаляване на концентрацията на общия неорганичен въглерод (TIC) в инокулума.

▼**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
Хексадецилтриметил (*) Амониев хлорид (катионен)	75	13	10
Изононилфенол $(етоксилат)_9$ (нейонен	41	32	10
Кокоамидпропил диметилхидрокси сулфобетаин (амфотерен)	60	23	11

(*) Беше добавен SiO_2 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:

а) стъкла за серум, запечатани със запушалки от бутилов каучук и алуминиеви капачки. Препоръчаният размер е 125 ml, с обща вместимост около 160 ml (в този случай обемът на всяко стъкло трябва да бъде 160 ± 1 ml). Може да се използва стъкло с по-малък размер, ако резултатите удовлетворяват условията, описани в точки 66 и 67;

б) анализатор за въглерод или друг инструмент (напр. газов хроматограф) за измерване на неорганичния въглерод;

▼M4

в) високоточни спринцовки за пробите от газове и течности;

г) орбитална клатачна машина в среда с контролирана температура;

д) източник на въздух без CO_2 — такъв въздух може да се приготви чрез пропускане на въздух през гранули натронкалк, или се използва газова смес от 80 % N_2/20 % /0_2 (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“ B.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 (KH_2PO_4) 8,50 g

Дикалиев хидрогенфосфат, ($K_2HPO_{4)}$ 21,75 g

Динатриев хидрогенфосфат дихидрат ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) 33,40 g

Амониев хлорид, (NH_4Cl) 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 ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) 36,40 g

Разтваря се във вода и се долива вода до 1 литър.

в) Магнезив сулфат хептахидрат ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 22,50 g

Разтваря се във вода и се долива вода до 1 литър.

г) Железен(III) хлорид хексахидрат ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 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

19. 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 (точка17).

Други реагенти

20. Концентрирана ортофосфорна киселина (H_3PO_4) (> 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 mm^2), а утайката трябва да се поддържа при аеробни условия, докато се употреби.

28. Друга възможност е след премахване на по-грубите частици утайката да се остави да се утаи или да се центрофугира (например при 1 100 g в продължение на 10 min). Отстранява се бистрият разтвор. Калта може да се промива с минерална среда. Концентрираната утайка се разрежда с минерална среда до концентрация 3—5 g суспендирани вещества на литър и след това се аерира, колкото се изисква.

29. Калта трябва да се вземе от обикновена добре работеща пречиствателна станция. Ако утайката трябва да бъде взета от силно натоварена пречиствателна станция, или има съмнение, че съдържа инхибитори, тя трябва да се промие. Ресуспендираната утайка се утаява или центрофугира след старателно разбъркване, отлива се 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 pH.

34. За да се намали съдържанието на IC, филтратът се барботира един час с въздух, несъдържащ CO_2 (точка 15, д) и се поддържа pH от 6,5 с помощта на ортофосфорна киселина (точка 20). Стойността на pH 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. Иноколумът 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 $HgCl_2$ или стерилизирани по друг начин (напр. чрез автоклавиране).

43. Разтворимите във вода изпитвани химикали и референтните химикали се добавят като водни изходни разтвори (точки 22, 23 и 24), за да се постигне концентрация от 10 до 20 mg C/l.

44. Неразтворимите изпитвани химикали и неразтворимите референтни химикали се добавят в стъклата по различни начини (вж. точка 22 а)—д) в зависимост от естеството на изпитвания химикал преди или след добавянето на инокулираната среда, според метода за третиране на изпитвания химикал. Ако се използва една от процедурите, посочени в точка 22, а)—д), контролните стъкла без химикал F_B (точка 42, б) се третират по сходен начин, но без да се добавя изпитваният химикал или референтният химикал.

45. Летливите изпитвани химикали следва да се инжектират в запечатаните стъкла (точка 47), като се използва микроспринцовка. Дозата се изчислява, като се вземат инжектираният обем и плътността на изпитвания химикал.

46. Когато е необходимо, в съдовете се добавя вода, за да може във всеки съд да има еднакво количество течност. Трябва да се гарантира, че съотношението между свободното пространство и течността (обикновено 1:2) и концентрацията на изпитвания химикал са такива, че в свободното пространство има достатъчно кислород за осъществяване на пълно биоразграждане.

▼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 °C ± 1 °C.

Вземане на проби

49. Схемата на вземане на проби зависи от латентния период и скоростта на биоразграждане на изпитвания химикал. В деня на вземане на проби се изваждат стъкла за анализ, като това се извършва най-малко веднъж седмично или по-често (напр. два пъти седмично), ако се цели съставяне на пълна крива на биоразграждане. Изискваният брой стъкла с повторения от групите F_T, F_B и F_C и, ако са използвани, F_I и F_S, се взема от клатачната машина (вж. точка 42). Изпитването обикновено трае 28 дни. Ако кривата на биоразграждане показва, че е достигната фаза на плато преди 28-ия ден, изпитването можа 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 CO_2 в стъклата се определя чрез измерване на концентрацията на неорганичен въглерод (IC) по време на инкубацията. Съществуват два препоръчани метода, описани по-долу, за измерване на количеството на IC, получен при изпитването. Тъй като методите могат да дадат леко различаващи се резултати, само един от тях може да се използва в изпитването.

51. Метод (а) се препоръчва, ако е вероятно средата да съдържа остатъци напр. от филтър от стъклени нишки и/или неразтворим изпитван химикал. Този анализ може да се извърши с използване на газов хроматограф, ако не е наличен анализатор на въглерод. Важно е когато се анализира газът от свободното пространство, стъклата да бъдат с температурата, която са имали при изпитването, или близка до нея. Метод (б) може да е по-лесен за прилагане в лаборатории, използващи анализатори на въглерод за измерване на IC. Важно е разтворът на натриев хидроксид (точка 21), който се използва за преобразуване на CO_2 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 CO_2 в N_2). 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 pH < 3 и уравновесяване при 20 °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 уравновесяване, 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 уравновесяване, 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

ДАННИ И ОТЧИТАНЕ

Изчисляване на резултатите

58. Ако се предположи, че изпитваният химикал е минерализиран 100 % до CO_2, ThIC, който е в повече спрямо получения в контролните съдове без добавен изпитван химикал, е равен на общия органичен въглерод (TOC), добавен във всяко стъкло в началото на изпитването, т.е.:

$$ThIC = TOC.$$

Масата (mg) на общия неорганичен въглерод (TIC) във всяко стъкло е:

$$TIC = (\text{mg C в течността} + \text{mg C в свободното пространство}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{Уравнение [1]}$$

където:

V_L = обем на течността в стъклото (литри);

C_L = концентрация на IC в течността (като въглерод в mg/l);

V_H = обем на свободното пространство (литри);

C_H = концентрация на IC в свободното пространство(като въглерод в mg/l).

Изчисляването на TIC 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:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \quad \text{Уравнение [2]}$$

където:

TIC_t = mg TIC в стъклото за изпитване в момент t;

TIC_b = средно mg TIC в контролните стъкла в момент t;

TOC = mg TOC 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 уравновесяването 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] $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, където V_B = обем на стъклото за серум.

Превръщане на CO_2 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 $TIC = V_L \times C_L$.

▼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_{FT}, 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

66. Изпитването се смята за валидно, ако:

а) средният процент на разграждане в съдовете F_C, съдържащи референтния химикал, е > 60 % към 14-ия ден на инкубацията; и

б) средното количество на общия неорганичен въглерод в контролните съдове F_B в края на изпитването е > 3 mg C/l.

Ако тези граници не са спазени, изпитването трябва да се повтори с инокулум от друг източник и/или трябва да се преразгледат използваните процедури. Например, ако проблемът се състои във високия добив на неорганичен въглерод в контролните съдове, трябва да се следва процедурата, посочена в точки 27—32.

(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 pH на средата в стъклата, в които не е добавяна киселина или основа; стойност, по-ниска от 6,5, е указание за възможна нитрификация. В такъв случай изпитването се повтаря с буферен разтвор с по-висока концентрация.

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 взети 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 B.4 от настоящото приложение, Определяне на пряката биологична разградимост — Метод за отделяне на CO_2 (метод B.4-B).

(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 ($C0_2$ headspace test).

(17) Battersby NS (1997). The ISO headspace $C0_2$ 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 B.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 B.11 от настоящото приложение, Изпитване за потискане дишането на активирана утайка.

(23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.

(24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 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

$ThCO_2$: 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, отделян 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 CO_2 и H_2O при аеробни условия, и до CH_4, CO_2 и H_2O при анаеробни условия.

Латентна фаза: Периодът от началото на изпитването до момента на достигане на аклиматизиране и/или адаптация на разлагащите микроорганизми, и на осезаемо увеличаване на степента на биоразграждане на даден изпитван химикал или органична материя (напр. 10 % от максималното теоретично биоразграждане или по-нисък процент, в зависимост от точността на начина на измерване).

Фаза на разграждане: Времето от края на латентната фаза до времето, при което са достигнати 90 % от максималното равнище на разграждане.

Фаза на плато: Фазата на плато е фазата, в която е достигнато максимално разграждане и кривата на биоразграждане е изравнена.

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

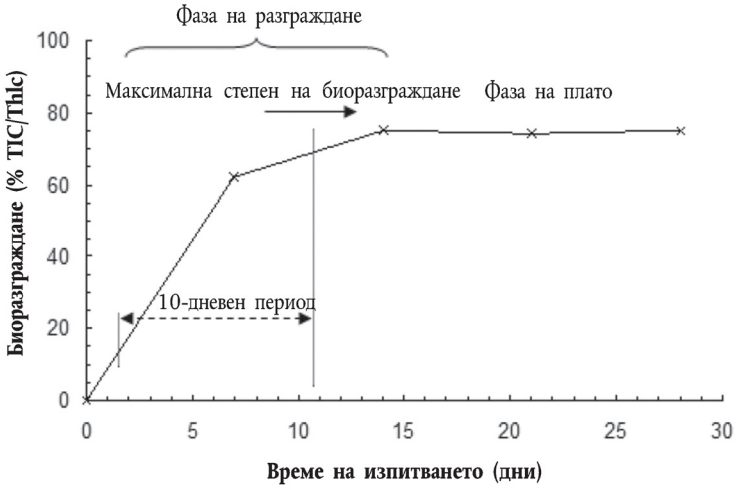
▼**M4**

Допълнение 2

Пример на крива на биоразграждане

Фигура 1

Биоразграждане на 1-октанол в изпитване за CO_2 в свободно пространство



Терминологичен справочник

Биоразграждане:

Фаза на разграждане:

Максимална степен на биоразграждане:

Фаза на плато:

10-дневен период:

Време на изпитването (дни)

▼M4

B.30. БИОАКУМУЛАЦИЯ В СУХОЗЕМНИ ОЛИГОХЕТИ

УВОД

1. Настоящият метод е еквивалентен на Насоките за изпитване (НИ) на ОИСР 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 B.13 от настоящото приложение (49) и „Биоакумулация в седиментните бентосни олигохети“ (53). Екстраполацията на данни за биоакумулацията 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 биоакумулацията 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 биоакумулацията в различни от риба организми. Метод за измерване на биоакумулацията 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 биоакумулацията 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 биоакумулацията 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 биоакумулацията в почвата. Други документи, които се споменават в настоящия метод за изпитване, са глава B.13 от настоящото приложение, озаглавена „Биоконцентрация: проточен тест за риби“ (49), и Насоки на ОИСР TG 315: „Биоакумулация в седиментните бентосни олигохети“ (53). Практическият опит по отношение на биоакумулацията 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 биоакумулация на свързващи се с почвата стабилни органометални съединения. Той е приложим и към метали и други микроелементи.

НЕОБХОДИМИ УСЛОВИЯ

5. Изпитвания за измерване на биоакумулацията на химикали в сухоземни олигохети са били извършвани с тежки метали (вж. напр. (63) и устойчиви органични химикали със стойности на log Kow 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 биоакумулация, т.е., аналози на химикали с известен потенциал за биоакумулация, и

— метали.

6. Преди започването на изследването следва да се събере информация за изпитвания химикал, напр. общоприето наименование, химично наименование (за предпочитане по IUPAC) структурна формула, номер по CAS, чистота, мерки за безопасност, правилни условия за съхранение и методи за анализ. Освен това следва да е известна и следната информация:

а) разтворимост във вода;

б) коефициент на разпределение октанол-вода, K_{ow};

в) коефициент на разпределение почва-вода, изразен като K_{oc};

г) парно налягане;

д) разградимост (напр. в почва или вода);

е) известни метаболити.

7. Могат да се използват белязани или небелязани с радиоактивен изотоп изпитвани химикали. Въпреки това, за да се улесни анализът, препоръчва се да се използва белязан изпитван химикал. Решението за това се взема в зависимост от границите на откриване или на необходимостта да се измерват изходният изпитван химикал и метаболитите му. Ако се използва белязан с радиоактивен изотоп химикал и се измерват общите радиоактивни остатъци, важно е белязаните остатъци в почвата и в опитните организми да се характеризират по отношение на процента съответно на изходния изпитван химикал и на белязания неизходен химикал, т.е., в пробите, взети при стационарно състояние или в края на фазата на поглъщане, за да може да се пресметне коефициентът на биоакумулация (BAF) за изходния изпитван химикал и за значимите почвени метаболити (вж. точка 50). Може да се наложи описаният тук метод да бъде изменен, напр. с оглед на получаването на достатъчно количество биомаса за измерване на небелязани с радиоактивен изотоп органични изпитвани химикали или метали. Ако се измерват общите радиоактивни остатъци (чрез течно 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 биоакумулация 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 биоакумулация.

8. Токсичността на изпитвания химикал спрямо използваните в изпитването видове следва да бъде известна, например ефективна концентрация (ECx) или леталната концентрация (LCx) за времето на фазата на поглъщане (напр. (19). Избраната концентрация на изпитвания химикал следва да бъде около 1 % от острата асимптотична LC_{50} 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 14C, 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 pH, съдържанието на органичен въглерод, зърнометричния състав (процентно съдържание на пясък, прах и глина) и за способността ѝ за задържане на вода (CЗВ).

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

11. Параметрите, които характеризират биоакумулацията на изпитвания химикал, включват коефициента на биоакумулация (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 биоакумулация 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

▼M4

биоакумулация 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 биоакумулация 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 биоакумулация (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 биоакумулация 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 биоакумулация и липофилността; тази връзка е добре изяснена при риби (47). Има връзка между съдържанието на липиди в рибата и биоакумулацията на такива химикали. За бентосните организми е установена сходна корелация, напр. (30) (44). Също така, тази корелация е установена за сухоземните олигохети, напр. (5) (6) (7) (14). Ако е налице достатъчно количество тъкан от червеи, липидното съдържание на изпитваните животни може да се определи върху същия биологичен материал, който се използва за определяне на концентрацията на изпитвания химикал. Друга възможност е да се използват контролни животни за определяне на съдържанието на липиди.

ВАЛИДНОСТ НА ИЗПИТВАНЕТО

17. За да бъде изпитването валидно, следва да са изпълнени следните критерии както при контролните, така и при третираните животни:

— В края на изпитването, общата смъртност по време на фазата на поглъщане и фазата на елиминиране не трябва да надвишава 10 % (земни червеи) или 20 % (енхитреиди) от общия брой въведени червеи.

— За *Eisenia fetida* и *Eisenia Andrei,* средната загуба на маса, измерена в края на фазата на поглъщане и в края на фазата на елиминиране, не трябва да надвишава 20 % от началната маса (f.w.) в началото на всяка от фазите.

ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

Животински видове за изпитването

18. За изпитването за биоакумулация 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 силанизирани стъкла. В такива ситуации оборудването трябва да се изхвърли след употреба (49). Трябва да се предотврати изпаряването на белязани с радиоактивен изотоп и летливи изпитвани обекти. Следва да се използват уловители (напр. стъклени бутилки за промиване на газове), които съдържат подходящи абсорбенти за задържане на остатъците, изпаряващи се от изпитвателните съдове.

Почва

20. Използваната в изпитването почва трябва да е с качество, което да позволява оцеляването и, за предпочитане, възпроизводството на изпитваните организми по време на периодите на аклиматизация и изпитване, без те да показват необичаен външен вид или поведение. Червеите трябва да могат да се заровят в почвата.

21. За субстрат при изпитванията се препоръчва да се използва изкуствената почва, описана в глава B.8 от настоящото приложение (48). Приготвянето на изкуствената почва за използване в изпитванията за биоакумулация, 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), pH, 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. Препоръчваната 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 накиснат 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 подпомагащ разтварянето агент.

24. За малко разтворимите във вода и в органични разтворители химикали, 2,0—2,5 g фино стрит кварцов пясък на изпитвателен съд могат да се смесят с количеството изпитван химикал, напр. като се използват хаванче и чукче, така че да се получи желаната концентрация за изпитването. Сместа от кварцов пясък и изпитван химикал се добавя в предварително навлажнената почва и старателно се смесва с подходящо количество дейонизирана вода, за да се получи необходимото съдържание на влага. Крайната смес се разпределя по съдовете за изпитване. Процедурата се повтаря за всяка изпитвателна концентрация, и се приготвя и подходяща контролна проба от 2,0—2,5 g фино стрит кварцов пясък за всеки изпитвателен съд.

25. Концентрацията на изпитвания химикал в почвата трябва да бъде определена след добавянето му. Преди въвеждането на изпитваните организми следва да бъде проверено хомогенното разпределение на изпитвания химикал в почвата. Методът, използван за добавяне на химикала, както и аргументите за избор на конкретна процедура за добавяне, следва да бъдат докладвани (24).

26. Преди въвеждането на организмите би било най-добре, ако е установено равновесие между почвата и фазата пори-вода; препоръчва се период от четири дни при 20 °C. За множество малко разтворими във вода органични химикали времето, необходимо за достигане на истинско равновесие между адсорбираните и разтворените фракции, може да се измерва в дни или месеци. В зависимост от целите на изследването, например когато трябва да се наподобят условията на околната среда, почвата с добавката може да „отлежава“ по-дълъг период, напр. три седмици при 20 °C (22) за метали.

Отглеждане на изпитваните организми

27. Червеите трябва за предпочитане да се държат в условията на непрекъснато отглеждане в лаборатория. Насоки за методите на отглеждане в лаборатория за *Eisenia fetida* и *Eisenia andrei*, както и за видовете енхитреиди, се дават в допълнение 5 (вж. също и (48) (51) (52).

28. Червеите, 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 BAF (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 BAF. Препоръчва се проба от проба от опитните червеи да се измери преди изпитването, за да се прецени средното влажно и средното сухо тегло.

33. Следва да се използва висок коефициент почва/червеи, за да се ограничи до минимум намаляването на концентрацията на изпитвания химикал в почвата по време на фазата на поглъщане. За *Eisenia fetida* и *Eisenia andrei* се препоръчва минимално количество от 50 g сухо тегло (с.т.) почва на червей, а за енхитреидите — минимално количество от 10—20 g с.т. почва на изпитвателен съд. Съдовете следва да съдържат слой почва от 2—3 cm (енхитреиди) или 4—5 cm (земни червеи).

34. Червеите, използвани при изпитване, се изваждат от средата за отглеждане (напр. за енхитреидите се използва златарска пинсета). Възрастните организми се прехвърлят в нетретирана изпитвателна почва за аклиматизиране и се хранят (вж. точка 36). Ако условията на изпитването се различават от условията на отглеждане, фаза от 24—72 h следва да е достатъчна за адаптирането на червеите към условията на изпитване. След аклиматизирането, земните червеи се изплакват чрез прехвърляне в стъклени блюда (напр. стъкло на Петри), съдържащи чиста вода, след което се претеглят преди да бъдат поставени в почвата, предназначена за изпитването. Преди претеглянето следва да се отстрани излишната вода от червеите, като те внимателно се допират до ръба на стъклото или като се попие водата от тях с помощта на леко влажна хартиена кърпа.

35. Поведението на червеите по отношение на заравянето в почвата следва да се наблюдава и регистрира. При изпитванията с дъждовни червеи, животните (контролни и 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 обосноват. Ако токсичността на изпитвания химикал (ECx) 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 елиминиране), 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 елиминиране.

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 елиминиране), 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 елиминиране) 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. pH 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 биоакумулация 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 °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 Ca 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

ДАННИ 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 биоакумулация при стационарно състояние BAFss 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 BAFss се изчислява BAFK, както е описано по-долу:

— Определя се коефициентът на акумулация (BAF_K) като съотношението k_s/k_e.

— Скоростите на поглъщане и елиминиране се изчисляват за предпочитане едновременно (вж. уравнение 11 в допълнение 2).

— Константата на скоростта на елиминиране (k_e) обикновено се определя чрез кривата на елиминиране (т.е., графика на концентрацията на изпитвания обект в червеите по време на фазата на елиминирането). След това се изчислява константата на скоростта на поглъщане k_s при дадени k_e и стойност на C_a, която се получава от кривата на поглъщането — вж. приложение 2 за описание на тези методи. Предпочитаният метод за получаване на BAF_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. EC_x, LC_x, 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 (pH, съдържание на общ органичен въглерод, зърнометричен състав (процент пясък, прах и глина), максимална способност за задържане на вода, процент вода в началото и в края на изпитването, други извършени измервания),

— подробна информация за обработката на пробите почва и червеи, включително подробности за процедурите по изготвяне, съхранение, добавяне на изпитвания обект, екстракция и аналитични процедури (в това число и прецизност) за изпитвания обект в червеите и почвата и липидното съдържание (ако се измерва), както и добива на изпитвания обект.

Резултати:

— смъртност на контролните червеи и на червеите във всеки изпитвателен съд и всякакво наблюдавано необичайно поведение (напр. избягване на почвата, липса на размножаване в изпитването за биоакумулация 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 ·kg^{-1} червеи), скорост на поглъщане в почвата (изразена в g почва·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 Oligochates*, Test Guideline № 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

(22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Достъпно за копиране на следния адрес в Интернет: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

(23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

(24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

(26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897-1905.

(27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501-1514.

(28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼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. & Eisentraeger, 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 ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

(44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588-595.

(45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17-26.

(46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* 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 B.8 от настоящото приложение, Токсичност за земни червеи

(49) Глава B.13 от настоящото приложение, Биоакумулация: проточен тест върху риби.

(50) Глава B.21 от настоящото приложение, Почвени микроорганизми: Изпитване на азотната трансформация.

(51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline № 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(52) Oecd (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline № 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline № 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

(54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

(55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

(56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.

(57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida.* RIVM Report № 607506001, Bilthoven.

(58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431-1436.

(59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

(60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.

(61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.

(62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107-127.

(63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110-2120.

(64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413-433.

(65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (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

Биоакумулация е увеличаването на концентрацията на изпитвания химикал във или върху организъм, отнесено към концентрацията на изпитвания химикал в заобикалящата среда. Биоакумулацията 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 биоакумулация (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 биоакумулация 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 $g.kg^{-1}$ сухо тегло на почвата) през този период е константа.

Коефициентите на биоакумулация 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 биоакумулация (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 биоакумулация 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} червеи $дни^{-1}$.

Фаза на елиминиране е времето, което следва след прехвърлянето на изпитваните организми от замърсена среда в среда, несъдържаща изпитвания обект, през което време се изследва елиминирането (или нетната загуба) на химикала от изпитваните организми.

Константата на скоростта на елиминиране (k_e) е числена стойност, определяща скоростта на намаляване на концентрацията на изпитвания обект във/върху изпитвания организъм, настъпваща след прехвърлянето на изпитвания организъм от среда, съдържаща изпитвания обект в среда, несъдържаща изпитвания химикал. k_e се изразява в $дни^{-1}$.

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

▼M4

Допълнение 2

Изчисляване на параметрите на поглъщане и елиминиране

Основната крайна точка на изпитването за биоакумулация е коефициентът на биоакумулация, 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 биоакумулация (BAF_K), константата на скоростта на поглъщане от почвата (k_s) и константата на скоростта на елиминиране (k_e), е да се използват компютърни нелинейни методи за оценка на параметрите, например, въз основа на моделите, описани в (68). При зададен набор от последователни данни за концентрацията като функция от времето и уравненията, описващи модела:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[уравнение 1]}$$

или

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[уравнение 2]}$$

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 елиминиране [$дни^{-1}$]

t_c = време в края на фазата на поглъщане,

тези компютърни програми изчисляват стойности за BAF_K, k_s и k_e.

Когато фоновата концентрация на неекспонирани червеи, например в ден 0, значително се различава от нула (както може да бъде при металите), тази фонова концентрация ($C_{a,0}$) следва да бъде включена в уравненията, така че те да приемат вида:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[уравнение 3]}$$

и

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[уравнение 4]}$$

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):

$$C_s = C_0(e^{-k}0^{t}) \qquad \text{[уравнение 5]}$$

▼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]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[уравнение 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[уравнение 7]}$$

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

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[уравнение 1]}$$

се свежда до:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

или до

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[уравнение 8]}$$

Тогава k_s/k_e x 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:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[уравнение 9]}$$

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):

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{(уравнение 10)}$$

▼**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).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \qquad \text{[уравнение 11]}$$

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; уравновесяване 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 pH 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 pH 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).

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 pH на почвата; претегляне и разпределение на червеите в изпитвателните съдове на случаен принцип; добавяне на дажбата храна; прехвърляне на червеите от оставащите подложени на експозиция повторения в съдове с чиста почва; вземане на проби почва и червеи след 4—6 часа за определяне на концентрация на изпитвания химикал.
1	Проверка на подаването на въздух, записване на поведението на червеите и на стойността на температурата; вземане на проби почва и червеи за определяне на концентрация на изпитвания химикал.
2	Същото като ден 1.
3	Проверка на подаването на въздух, на поведението на червеите и на стойността на температурата.
4	Същото като ден 1.
5 – 6	Същото като ден 3.
7	Същото като ден 1; добавяне на дажбата храна; проверка на влажността на почвата чрез повторно претегляне на изпитвателните съдове, компенсиране на загубите на вода от изпаряване.
8 – 9	Същото като ден 3.
10	Същото като ден 1.
11 – 13	Същото като ден 3.
14	Същото като ден 1; добавяне на дажбата храна; проверка на влажността на почвата чрез повторно претегляне на изпитвателните съдове, компенсиране на загубите на вода от изпаряване.
15 – 16	Същото като ден 3.
17	Същото като ден 1.

▼**M4**

Ден	Дейност
18 – 20	Същото като ден 3.
21	Същото като ден 1; измерване на температура и pH на почвата; проверка на влажността на почвата чрез повторно претегляне на изпитвателните съдове; вземане на проби от почва и червеи от съдовете за контрол на разтворителя.
	Приготвянето на почвата преди началото на фазата на елиминиране се извършва по същия начин, по който се извършва преди фазата на поглъщане.
	Дейностите, описани за ден 3, следва да се извършват ежедневно (най-малкото в работни дни).

Изпитване с енхитреиди

а) Фаза на поглъщане с 8 дати за вземане на проби, използвани за изчисляване на кинетичните параметри

Ден	Дейност
– 6	Подготвяне на приготвената почва в продължение на 48 h.
– 4	Добавяне на разтвор на изпитвания химикал в част от почвата; изпаряване на разтворителя, ако има такъв; смесване на съставките на почвата; разпределяне на почвата по изпитвателните съдове; уравновесяване при условията на изпитването в продължение на 4 дни (3 седмици при почва с добавен метал).
– 3 — – 1	Отделяне на опитните организми от средата за отглеждане за аклиматизиране; приготвяне и овлажняване на съставките на почвата.
0	Измерване на температура и pH на почвата; вземане на проби почва от третираните съдове и съдовете за контрол на разтворителя за определяне на концентрацията на изпитвания химикал; добавяне на дажбата храна към почвата; претегляне и разпределение на червеите в изпитвателните съдове на случаен принцип; отделяне на достатъчно по-малки проби червеи за определяне на стойностите на аналитичния фон, на сухото и влажното тегло и на съдържанието на липиди; претегляне на всички изпитвателни съдове за контрол на влажността на почвата; проверка на подаването на въздух, ако се използва затворена система.
1	Проверка на подаването на въздух, записване на поведението на червеите и на стойността на температурата; вземане на проби почва и червеи за определяне на концентрацията на изпитвания обект.
2	Същото като ден 1.
3	Проверка на подаването на въздух, на поведението на червеите и на стойността на температурата.
4	Същото като ден 1.
5 – 6	Същото като ден 3.
7	Същото като ден 1; добавяне на дажбата храна към почвата; проверка на влажността на почвата чрез повторно претегляне на изпитвателните съдове, компенсиране на загубите на вода от изпаряване.
9	Същото като ден 1.
10	Същото като ден 3.

▼**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 pH 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 проготвяне 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 B.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 ОИСР 207 (48).
Кварцов пясък	70 %	Промишлен 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 %.

Приготвяне

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 уравновеси/стабилизира киселинността. За определяне на pH се използва смес от почва и разтвор на 1 M KCl в съотношение 1:5. Ако стойността на pH не е в желания интервал (6,0 ± 0,5), в почвата се добавя достатъчно количество $CaCO_3$, 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 биоакумулация от почвата

Земни червеи

Препоръчваните 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 биоакумулация.

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 pH 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. Препоръчваната в ISO (35) среда за отглеждане е смес 50:50 от конски или говежди тор и торф. Средата трябва да има стойност на pH 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. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼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 pH и текстурата (Jänsch et al., 2005). През последните години този вид често е бил използван в изследванията за екотоксичност поради това, че лесно се поддава на отглеждане и изпитване (напр. Kuperman et al. 2003). Независимо от това, видът е дребен (3—12 mm; средно 7 mm (Westheide & Müller 1996), което прави боравенето с него по-сложно, отколкото с *Enchytraeus albidus*. Когато този вид се използва вместо *Enchytraeus albidus*, размерът на изпитвателния съд може да е по-малък, без това да е необходимо. Освен това следва да се има предвид, че видът се възпроизвежда много бързо, времето за достигане на зрялост е по-малко от 20 дни при 20 ± 2 °C (Achazi et al. 1999) и дори по-кратко при по-висока температура.

Енхитреидите от вида *Enchytraeus albidus* (както и други видове *Enchytraeus*) могат да бъдат развъждани в големи пластмасови кутии (напр. 30 × 60 × 10 cm, или 20 × 12 × 8 cm, които са подходящи за получаване на култура от червеи от по-малък размер), които се пълнят със смес от изкуствена почва и незамърсена градинска почва без добавки, достъпна в търговската мрежа. Употребата на компост следва да се избягва, тъй като той може да съдържа токсични химикали, като тежки метали. Преди употреба фауната следва да бъдат елиминирана 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 pH 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 смила, 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.